



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo

**“Dinoflagelados toxígenos en el Mar Argentino.
Diversidad, abundancia y toxinas asociadas.”**

**Trabajo de tesis para optar por el grado de Doctor en
Ciencias Naturales**

Año 2017

Autor

Elena Fabro

Directores

Gastón O. Almandoz y Bernd Krock

A mis grandiosos padres Clarita y Peli,
a quienes debo mi admiración, amor y respeto por la vida.

Agradecimientos

Principalmente a mis directores: Gastón Almandoz y Bernd Krock por su confianza y apoyo constate durante el desarrollo de esta tesis, sin los cuales no podría haberse concretado. Especialmente a Gastón por su presencia y guía cotidiana y su gran paciencia. A Bernd por recibirme en su laboratorio y por el entrenamiento brindado en la División de Química Ecológica del AWI.

A la Dra. Martha Ferrario por su confianza y por otorgarme el privilegio de ser parte de su grupo de trabajo.

Al Dr. Urban Tillmann por sus enseñanzas, generosidad y por abrir las puertas de su laboratorio durante mis estadías en el AWI y al Dr. Allan Cembella por su apoyo y por haberme dado la posibilidad de trabajar con su grupo de investigadores.

A mis compañeros de la División de Ficología del Museo Nacional de La Plata quienes compartieron consejos y experiencias. A Patricia Sarmiento por su predisposición y entusiasmo para fotografiar hasta a los mini-dinos al MEB.

Al CONICET, a la Facultad de Ciencias Naturales de la UNLP y al programa IMCONET cuyos subsidios y becas han permitido la realización de este estudio.

A mi familia y amigos de toda la vida, pero especialmente a mis padres quienes siempre confiaron en mí y jamás dudaron en brindarme su apoyo en todas las idas y vueltas que he tenido, por su amor incondicional y por todas las oportunidades que me han dado, que sé que les han costado muchísimo esfuerzo y sacrificio. Todos mis logros y aprendizajes les pertenecen.

A mi hermano Julián por sacarme una carcajada hasta en los momentos más tristes.

Al Chini, el amor de mi vida, por estar siempre a mi lado.

A mis amigos los Pishers con quienes compartimos una larga historia de desarrollo académico y emocional, especialmente a Sol, Pili, Tucu y Mica.

A mis hijos de cuatro patas: Pipo, Muler, Namiyo, Cuervi, Tigrilla, Sola, Forriza, Viejo, Corda Shila, Cali, Piola, Porro y Rulo, quienes alegran mi vida día a día con su cariño y pureza. A las Negras, en mi corazón siempre.

Índice

Resumen en castellano.....	4
Summary.....	7
Trabajos publicados.....	10
Capítulo 1: Introducción general y objetivos.....	11
Capítulo 2: Materiales y Métodos.....	20
Capítulo 3: Abundancia y composición general del nano y microplancton.....	36
Capítulo 4: Especies de <i>Dinophysis</i> y toxinas asociadas.....	57
Capítulo 5: Especies de <i>Alexandrium</i> y toxinas asociadas.....	92
Capítulo 6: <i>Protoceratium reticulatum</i> , <i>Gonyaulax spinifera</i> y toxinas asociadas.....	128
Capítulo 7: Especies de <i>Azadinium</i> y toxinas asociadas.....	146
Capítulo 8: Consideraciones finales.....	168
Referencias.....	173

Resumen

Los dinoflagelados comprenden el principal grupo de microalgas asociado con la producción de Floraciones Algales Nocivas (FANs) en ambientes marinos, principalmente debido a su capacidad de producir una gran variedad de compuestos tóxicos que, al ascender en la cadena trófica, pueden causar severos daños en la salud humana y de otros vertebrados. En las últimas décadas, los fenómenos de FANs han cobrado una connotación alarmante a nivel mundial debido a su aparente incremento espacio-temporal y a sus efectos devastadores en relación con la salud humana y aspectos socio-económicos, dando lugar al desarrollo de un gran número de estudios relacionados con ésta temática a nivel mundial. En la Argentina, los episodios más importantes de FANs han estado vinculados a la presencia de distintas especies de dinoflagelados, principalmente pertenecientes al género *Alexandrium*, que han ocasionado severos daños en la salud pública, causando la muerte de varias personas, mortandad de peces y perjuicios económicos. No obstante, en los últimos años se han detectado nuevas especies toxígenas y distintos grupos de toxinas desconocidos previamente en la región, sobre los cuales el conocimiento de su diversidad y distribución aún es limitado.

El objetivo general de esta tesis doctoral fue profundizar el conocimiento sobre la diversidad, abundancia, dinámica espacio-temporal y perfil de toxinas de los dinoflagelados toxígenos presentes en distintas regiones del Mar Argentino. A tal fin se realizaron cuatro campañas oceanográficas a bordo de distintas embarcaciones entre los años 2012 y 2016, en las que se realizaron muestreos en un total de 122 estaciones. En cada una de ellas se colectaron muestras de botella y de red para el análisis del fitoplancton y ficotoxinas, según protocolos de muestreo específicos que permitieron relacionar las densidades celulares y las concentraciones de toxinas y así estimar la producción de toxinas por célula en ambientes naturales. Las muestras de fitoplancton se analizaron con microscopía óptica y electrónica de barrido. Adicionalmente, se realizaron análisis moleculares del género *Alexandrium* tendientes a evaluar su diversidad específica. El análisis de toxinas lipofílicas se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) acoplada con espectrometría de masa en

tándem (MS-MS), mientras que las toxinas hidrofílicas se analizaron mediante HPLC por derivación post-columna y detección fluorescente.

El grupo de los dinoflagelados se observó en el 95 % de las estaciones de muestreo, aunque en términos de abundancia solo representó el grupo dominante del fitoplancton en ocho estaciones. Las densidades máximas de dinoflagelados ($\sim 2 \times 10^6$ cél. L⁻¹) se observaron en la región norte del talud (40 °S) durante una floración de *Prorocentrum cordatum*. Otros representantes numéricamente importantes fueron distintas especies de los géneros *Gyrodinium*, *Tripos* y *Protoperidinium*, así como pequeños dinoflagelados desnudos (< 10 µm).

En el presente estudio se detectó la presencia de 20 especies pertenecientes a cinco géneros de dinoflagelados toxígenos, de los cuales cuatro estuvieron asociados a distintos grupos de ficotoxinas: *Dinophysis* a pectenotoxinas (PTX) y ácido okadaico (AO), *Alexandrium* a toxinas paralizantes de moluscos (TPM) y espirólidos (SPX), *Protoceratium* a yessotoxinas (YTX) y *Azadinium* a azaspirácidos (AZA).

El género *Dinophysis* presentó dos especies asociadas mayormente con PTX y excepcionalmente con AO: *D. acuminata* y *D. tripos*. Esta última especie se encontró además asociada, por primera vez a nivel mundial, con la detección de PTX2-sa, un análogo relacionado comúnmente con modificaciones en la PTX-2 que ocurren como resultado de la digestión en moluscos. Por el contrario, la presencia de *D. caudata* y *D. norvegica*, esta última reconocida como causante de floraciones toxígenas en el Hemisferio Norte y hallada por primera vez en el suroeste Atlántico, no estuvo asociada con la detección de toxinas.

El género *Alexandrium* se detectó con frecuencia y en una amplia área de distribución. Se lo encontró asociado a una gran variedad de perfiles de TPM entre los cuales sobresalieron, debido a su elevada toxicidad potencial, aquellos con altas proporciones de los análogos GTX1/4 detectados durante la campaña de primavera. Mediante la aplicación de técnicas moleculares y de microscopía se detectó por primera vez para el área de estudio a las especies *A. minutum* y *A. ostenfeldii*, las cuales estuvieron asociadas con TPM y SPX, respectivamente. Por otro lado, el análisis filogenético de células aisladas frente a Península Valdés confirmó la presencia del ribotipo I del complejo de especies *A. tamarense*, señalado previamente a partir del estudio de una cepa aislada frente a Mar del Plata.

Si bien durante este estudio se observaron dos especies consideradas como potenciales productoras de YTX, *Protoceratium reticulatum* y *Gonyaulax spinifera*, los

resultados obtenidos sugieren que el principal productor de YTX en el Mar Argentino es *Protoceratium reticulatum*. Por el contrario, *Gonyaulax spinifera* no presentó una asociación clara con YTX, y *Lingulodinium polyedra*, especie también considerada como productora de YTX a nivel mundial, no se observó en ninguna de las cuatro campañas realizadas. Las mayores concentraciones de YTX y de células de *P. reticulatum* se registraron en el Golfo San Jorge, lo cual representa un llamado de atención sobre el desarrollo de futuros eventos tóxicos en la zona.

El género *Azadinium* alcanzó las máximas abundancias entre los dinoflagelados tóxicos observados en este estudio, con picos de 154.000 cél. L⁻¹ en aguas del talud. Su presencia estuvo asociada a la detección de AZA-2 por primera vez para muestras de plancton de la región. Asimismo, su distribución geográfica, restringida en base a estudios previos a la zona norte del Mar Argentino (40 °S), se extendió hacia el sur hasta los 55°S. Estudios ultraestructurales permitieron identificar por primera vez para la zona a *A. obesum* y confirmar la presencia de otras tres especies recientemente citadas en el Mar Argentino (*A. dexteroporum*, *A. poporum* y *A. luciferelloides*), de las cuales dos (*A. dexteroporum* y *A. poporum*) son productoras de AZAs, así como detectar ejemplares cuya morfología no coincide con ninguna de las especies descriptas actualmente en la bibliografía.

El presente estudio representa el primer análisis de las especies toxígenas de dinoflagelados presentes en el Mar Argentino mediante un enfoque integrado que incluye análisis microscópicos, moleculares y toxinológicos aplicados a muestras de campo. Los resultados obtenidos indican que la diversidad y ocurrencia de dinoflagelados tóxicos y sus respectivas toxinas presentes en el Mar Argentino es mayor a la considerada anteriormente y denota la necesidad de continuar y profundizar los estudios en la zona, especialmente mediante el establecimiento de cultivos celulares que permitan aumentar el conocimiento sobre su variabilidad morfológica, genética y toxinológica.

Summary

Dinoflagellates comprise the main group of microalgae associated with the production of Harmful Algal Blooms (HABs) in marine environments, mainly due to their ability to produce a large variety of toxic compounds that, when ascending in the food web, can cause severe damages in human and other vertebrate health. In the last decades, the frequency and intensity of HABs and their impacts on health and socio-economic aspects have been apparently increased, leading to the development of a large number of studies related to this topic worldwide. In Argentina, the most important HABs episodes have been linked to the presence of different species of dinoflagellates, mainly from the genus *Alexandrium*, which caused severe damage to public health, death of several people, fish mortality and economic losses. However, new toxigenic species and different groups of toxins previously unknown have been recently detected in the region, from which the knowledge on the diversity and distribution is still limited.

The main goal of this PhD thesis was to contribute to the knowledge on the diversity, abundance, spatio-temporal dynamics and toxin profile of the toxigenic dinoflagellates from the Argentine Sea. For this purpose, four oceanographic expeditions were carried out onboard different vessels between 2012 and 2016, comprising a total of 122 sampling stations. In each station, bottle and net samples were collected for phytoplankton and phycotoxins analysis, applying specific sampling protocols designed to relate cell densities and toxin concentrations, and thus estimate the toxin production per cell in natural environments. The phytoplankton samples were analyzed by optical and scanning electron microscopy. In addition, molecular analyzes of the genus *Alexandrium* were carried out to evaluate its specific diversity. Lipophilic toxin analyses were performed by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with tandem mass spectrometry (MS-MS), while hydrophilic toxins were analyzed by HPLC by post-column derivation and fluorescence detection.

Dinoflagellates were observed in 95 % of the sampling stations, although in terms of abundance they only represented the dominant group of phytoplankton in eight stations. Their maximum cell densities ($\sim 2 \times 10^6$ cells L⁻¹) were observed in the northern slope region (40 °S) during a bloom of *Prorocentrum cordatum*. Other

important dinoflagellates in terms of abundances were different species of *Gyrodinium*, *Tripos* and *Protoperidinium*, as well as small naked dinoflagellates.

During the present study it was possible to detect the presence of five genera of toxigenic dinoflagellates, comprising 20 species, of which four were associated to different groups of phycotoxins: *Dinophysis* to pectenotoxins (PTX) and okadaic acid (OA), *Alexandrium* to paralytic shellfish toxins (PST) and spirolides (SPX), *Protoceratium* to yessotoxins (YTX) and *Azadinium* to azaspiracids (AZA).

The genus *Dinophysis* presented two species, *D. acuminata* and *D. tripos*, mainly associated with PTX and exceptionally with AO. The latter species was also associated, for the first time worldwide, with the detection of PTX2-sa, an analogue commonly related to PTX-2 modifications that occur in mollusks as a result of the digestion process. In contrast, the presence of *D. caudata* and *D. norvegica*, the latter recognized as the cause of toxigenic blooms in the Northern Hemisphere and found for the first time in the Southwest Atlantic, was not associated with the detection of toxins.

The genus *Alexandrium* was frequently detected, showing a wide distribution area and associated to a large variety of PST profiles; among them, profiles with high proportions of the GTX1/4 analogues detected during spring were particularly important due to the high potential toxicity of those analogues. Molecular and microscopy techniques applied in this study allowed to detect the presence of *A. minutum* and *A. ostenfeldii* for the first time in the study area, associated with PST and SPX, respectively. On the other hand, phylogenetic analysis of cells isolated from Valdés Peninsula confirmed the presence of the ribotype I of the *A. tamarense* species complex, previously identified from a strain isolated from Mar del Plata.

During this study two species considered as potential producers of YTX were detected, *Protoceratium reticulatum* and *Gonyaulax spinifera*. However, the results suggest that the main producer of YTX in the Argentine Sea is *Protoceratium reticulatum*. In contrast, there was no clear association between *Gonyaulax spinifera* and YTX, and *Lingulodinium polyedra*, a species also considered worldwide as a producer of YTX, was not observed in any of the four sampling expeditions. The highest concentrations of YTX and *P. reticulatum* cells were recorded in the San Jorge Gulf, which is a call for attention on the development of future toxic events in the area.

The genus *Azadinium* reached the maximum abundances among the toxigenic dinoflagellates observed in this study, with peaks of 154,000 cells L⁻¹ detected from slope waters. Its presence was associated with the detection of AZA-2 in plankton

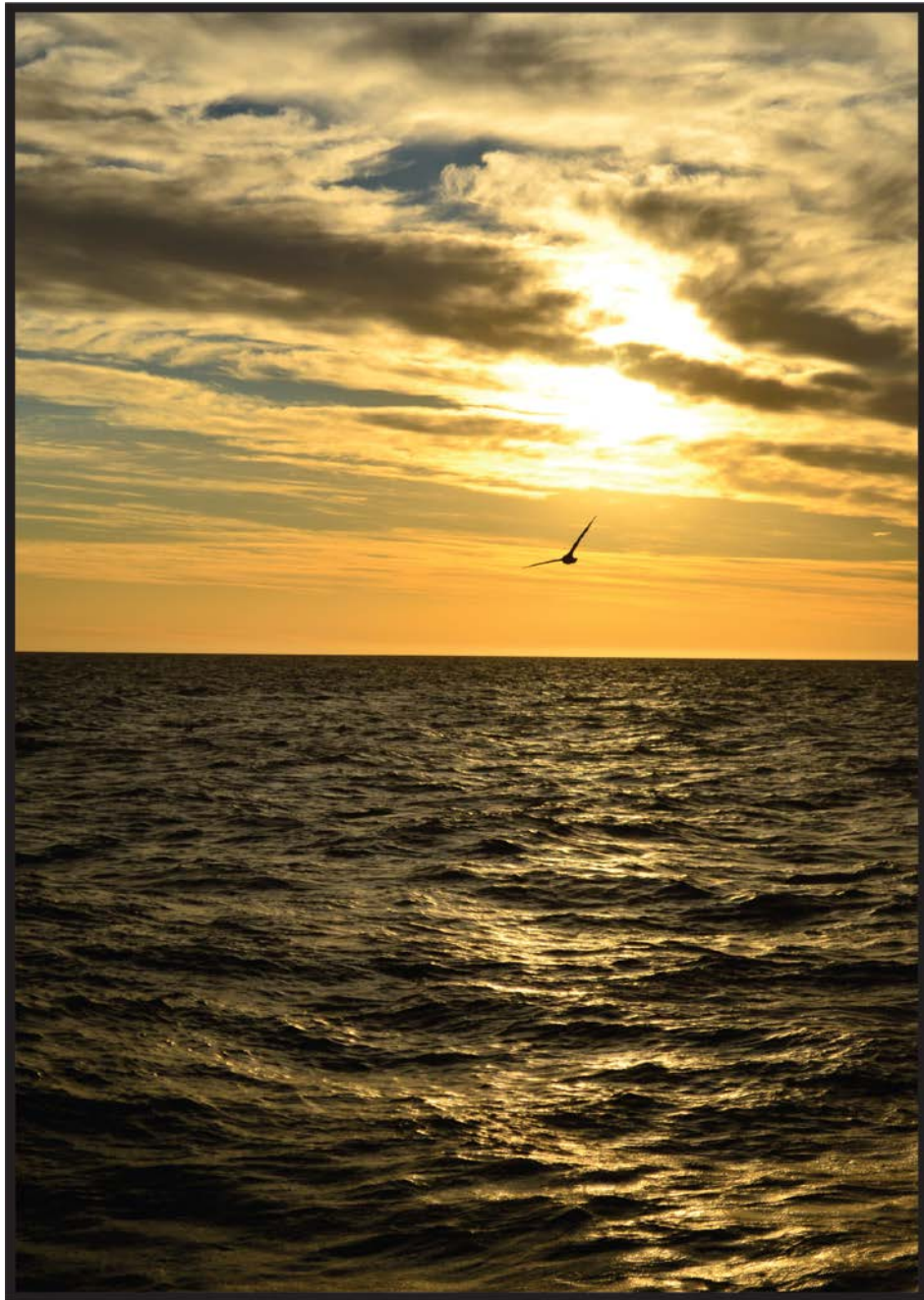
samples for the first time in the study area. Likewise, its geographical distribution, previously restricted to the northern zone of the Argentine Sea (40 °S), is now extended southward to 55 °S. Ultrastructural studies allowed the identification of *A. obesum* for the first time in the Argentine Sea and confirmed the presence of other three recently mentioned species (*A. dexteroporum*, *A. poporum* and *A. luciferelloides*), of which two (*A. dexteroporum* and *A. poporum*) are confirmed as AZAs producers, and the presence of specimens with a different morphology that did not match with the currently described species.

The present study represents the first attempt to analyze the toxigenic dinoflagellate species present in the Argentine Sea through an integrated approach that includes microscopic, molecular and toxinological analyzes applied to field samples. The results indicate that the diversity and occurrence of toxigenic dinoflagellates and their respective toxins in the Argentine Sea is greater than previously considered and also highlights the need to continue and improve the studies in the area, especially through the establishment of cultures that allow increasing the knowledge about its morphological, genetic and toxinological variability.

Trabajos publicados

- Fabro, E., Almandoz, G. O., Ferrario, M. E., Hoffmeyer, M. S., Pettigrosso, R. E., Uibrig, R., Krock, B., 2015. Co-occurrence of *Dinophysis tripos* and pectenotoxins in Argentinean shelf waters. *Harmful Algae* 42, 25–33.
- Fabro, E., Almandoz, G. O., Ferrario, M., Tillmann, U., Cembella, A., Krock, B., 2016. Distribution of *Dinophysis* species and their association with lipophilic phycotoxins in plankton from the Argentine Sea. *Harmful algae* 59, 31-41.
- Fabro, E., Almandoz, G. O., Ferrario, M., John, U., Tillmann, U., Toebe, K., Cembella, A., 2017. Morphological, molecular and toxin analysis of field populations of *Alexandrium* genus from the Argentine Sea. *Journal of Phycology*. DOI: 10.1111/jpy.12574

Capítulo 1: Introducción general



1 Introducción general

Las microalgas planctónicas constituyen un componente esencial de los mares y océanos del mundo, representan el primer eslabón en la cadena alimentaria y son responsables de la mayor parte de la productividad primaria de los ecosistemas marinos (Graham & Wilcox, 2000). A pesar de que sus floraciones, definidas como períodos de rápido crecimiento y acumulación de fitoplancton (Carreto et al., 2007), resultan mayormente beneficiosas para la acuicultura y las pesquerías, en algunos casos pueden acarrear efectos negativos tanto para el hombre como para los ecosistemas naturales. A este tipo de proliferaciones dañinas se las conoce comúnmente como “mareas rojas”, ya que en casos excepcionales una elevada densidad celular puede ocasionar cambios en la coloración del agua, debido a los pigmentos presentes en los organismos. Sin embargo, no todas las floraciones nocivas se presentan acompañadas de episodios de discoloración del agua, ni todas las discoloraciones son rojas (Fig. 1.1). En consecuencia, la comunidad científica acuñó el término de Floraciones Algales Nocivas (FANs), para hacer referencia a las apariciones de un grupo heterogéneo de microorganismos que son percibidos como dañinos para el hombre por sus efectos adversos en la salud humana, en las explotaciones de acuicultura y turísticas o en las poblaciones naturales de organismos marinos (Hallegraeff, 2004)

Existen varios tipos de FANs según el perjuicio o daño que provoquen, ya sea al hombre como a otros animales o en el ambiente: a) las producidas por especies no tóxicas pero que alcanzan altas biomásas durante sus floraciones, generando una disminución en la penetración de luz lo cual, junto con la proliferación de bacterias, desencadena un desbalance entre las tasas fotosintética y de respiración, causando desoxigenación de los cuerpos de agua y en algunos casos la muerte de organismos marinos (Tett & Edwards, 2002); b) las que pueden provocar daños mecánicos en agallas de peces (causados por ejemplo por algunos géneros de diatomeas como *Chaetoceros* que poseen prolongaciones filiformes) o lesiones en peces y otros organismos acuáticos como resultado de la secreción de sustancias hemolíticas c) las que generan acumulaciones de espuma en las orillas de sitios turísticos provocando contaminación visual y olores desagradables que afectan de manera negativa a la industria del turismo y las actividades de recreación humana, son causadas principalmente por altas concentraciones de haptofíceas y diatomeas; d) las provocadas

por especies productoras de sustancias que afectan al hombre a través del contacto directo con el agua de mar o con sus aerosoles, generando principalmente problemas respiratorios e irritaciones en la piel, como las causadas por el dinoflagelado *Karenia brevis* (Hallegraeff, 2010); e) las generadas por especies que producen toxinas que se acumulan y transfieren a través de las redes tróficas y generan intoxicaciones en aves y mamíferos, incluido el hombre (Fig. 1.2); y f) las producidas por especies que hasta el momento no son consideradas como toxígenas para el hombre pero que han presentado toxicidad en ensayos con ratones de laboratorio, de manera que representan un peligro potencial (Hallegraeff, 2004; Lassus et al., 2016).

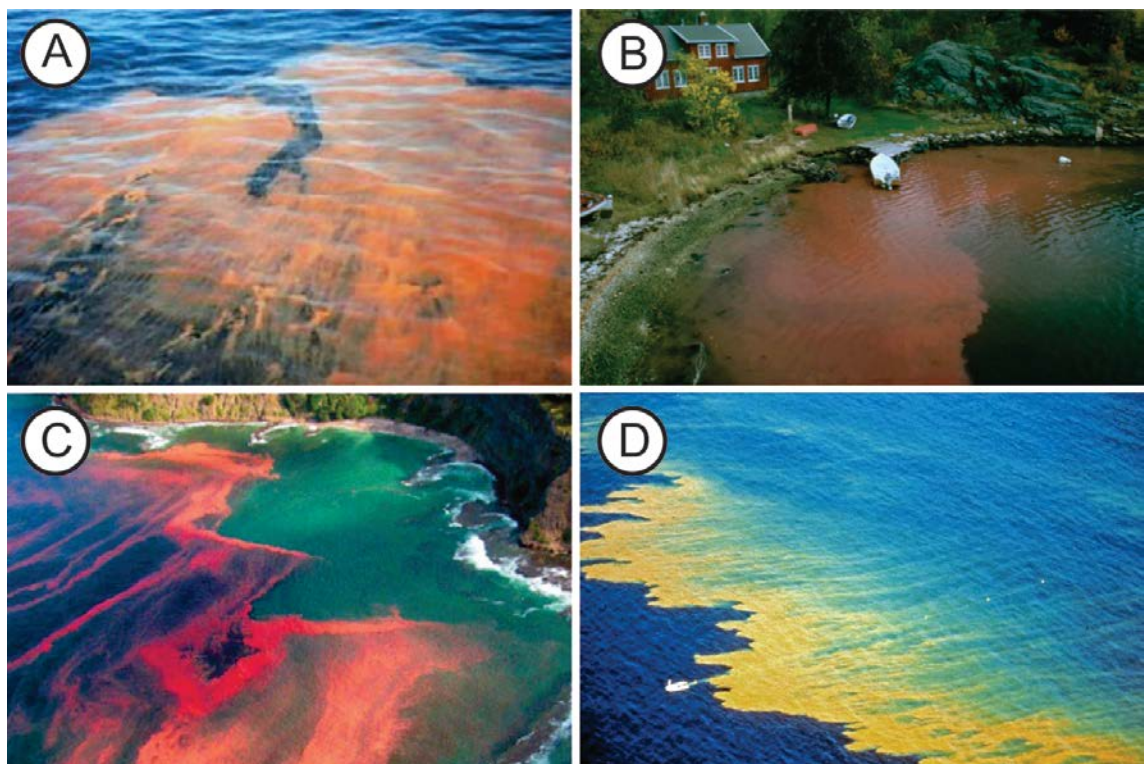


Fig. 1.1: Fotografías de discoloraciones en el agua resultado de altas abundancias celulares planctónicas. A) floración en la costa patagónica (tomado de <http://www.dicyt.com/viewNews.php?newsId=14205>). B) floración de dinoflagelados del género *Dinophysis* en Noruega (tomado de <http://www.whoi.edu/redtide/>). C) floración del dinoflagelado *Noctiluca scintillans* en Nueva Zelanda (tomado de <http://www.whoi.edu/redtide/>) D) floración en California, Estados Unidos (tomado de <http://www.whoi.edu/redtide/>).

En la lista de microalgas toxígenas elaborada por la COI-UNESCO (Comisión Oceanográfica Intergubernamental de la UNESCO) se incluyen actualmente a 178 especies a nivel mundial, tanto de ambientes marinos como dulceacuícolas (Moestrup et al., 2017). Entre ellas se encuentran representantes de diferentes grupos algales, tales como rafidoficeas, haptoficeas, dictyochoficeas, cianoficeas y diatomeas. Sin embargo,

el grupo con mayor cantidad de taxones toxígenos (98) es el de las dinofíceas (dinoflagelados).

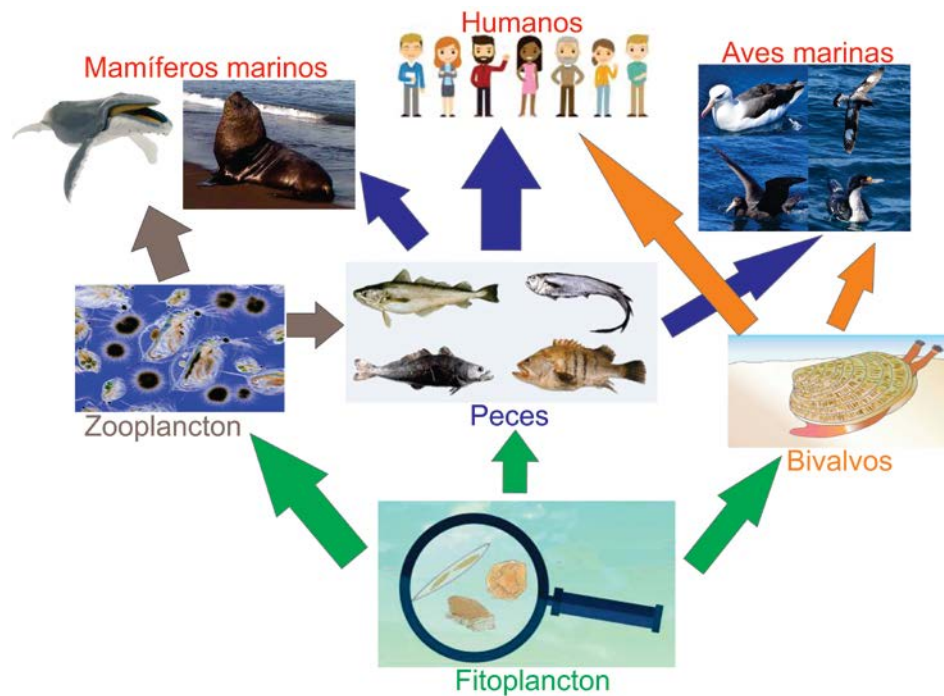
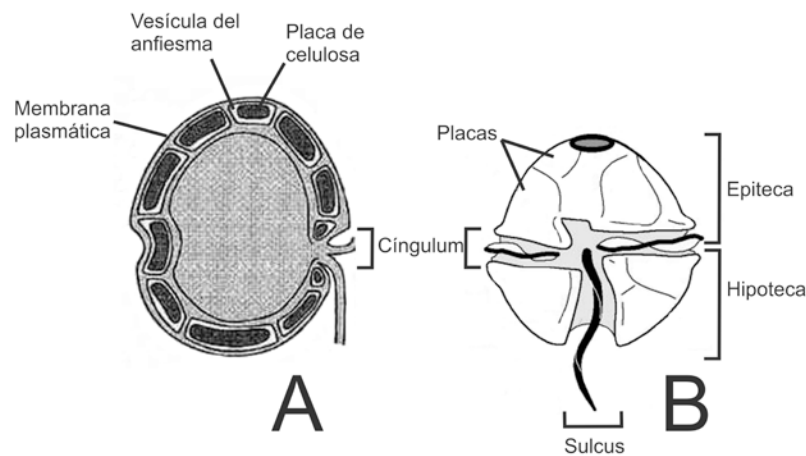


Fig. 1.2: Esquema de la transferencia de toxinas producidas por el fitoplancton a través de la red trófica.

Los dinoflagelados son protistas unicelulares pertenecientes al Superfilo Alveolata, el cual reúne también a ciliados y apicomplejos por presentar una cubierta celular denominada anfiesma por debajo de la membrana plasmática, formada por vesículas de una estructura proteica compleja (Fig. 1.3 A). Sin embargo, los dinoflagelados poseen características morfológicas y ultraestructurales únicas, como la presencia de un núcleo (dinocarion) con un enorme genoma desprovisto de las típicas proteínas histonas eucariotas, el cual no pierde la membrana nuclear durante la división mitótica y posee los filamentos de cromatina permanentemente condensados (Gómez et al., 2011a). Las células móviles presentan dos flagelos bien diferenciados, uno transversal acintado que se aloja en un surco ecuatorial (cíngulum), y otro en forma de látigo que se dirige posteriormente y se aloja en un surco longitudinal ventral (sulcus) (Fig. 1.3 B). Estos dos flagelos desiguales proporcionan a los dinoflagelados un característico movimiento de nado rotacional. Si bien la morfología celular descrita anteriormente es la típica dentro de los dinoflagelados, cabe aclarar que el grupo incluye también órdenes caracterizados por una morfología celular diferente, con ambos flagelos emergiendo apicalmente (*Prorocentrales*), con el cíngulum desplazado

apicalmente (*Dinophysisales*) o con un único flagelo y una morfología “aberrante” (*Noctilucales*). Dentro de los dinoflagelados se encuentran representantes heterótrofos, autótrofos y mixótrofos, así como también parásitos y simbios, que se distribuyen en



mares y cuerpos de agua dulce de todo el mundo (Graham & Wilcox, 2000).

Fig. 1.3: Esquemas de células de un dinoflagelado tecado. A) esquema de un corte longitudinal en vista lateral. B) esquema de una célula en vista ventral. Tomados de https://www.sinchi.org.com/images/publicaciones/microalgas_ewook.swf.

Los dinoflagelados se pueden dividir en dos grandes grupos: tecados y atecados o desnudos, según la presencia o ausencia de teca. La teca resulta de la deposición de celulosa en forma de placas dentro de las vesículas del anfiesma, las cuales otorgan un aspecto rígido a la célula. Dentro del grupo de los tecados la clasificación taxonómica se basa principalmente en la cantidad, disposición y forma de las distintas placas, mientras que dentro de los atecados las características utilizadas para la clasificación son el contorno celular y algunos caracteres ultraestructurales como las características del aparato flagelar (Balech, 1988) junto con el recorrido del surco apical o acrobase, además de caracteres moleculares (Daughjerg et al., 2000).

Con la emergencia de las técnicas moleculares la filogenia y clasificación de los dinoflagelados han sido modificadas, a la vez que ha aumentado el conocimiento respecto de la diversidad dentro de los diferentes grupos (Zardoya et al., 1995; Saldarriaga et al., 2004). Particularmente considerando a los dinoflagelados toxígenos, estas técnicas han permitido diferenciar especies crípticas, como por ejemplo los cinco ribotipos incluidos en el complejo de especies *Alexandrium tamarense*, un género caracterizado mundialmente como el principal causante de intoxicaciones por toxinas

paralizantes (John et al., 2014). Asimismo, se ha determinado la existencia de una alta variabilidad morfológica intra-específica y por lo tanto se han agrupado dentro de una única especie a morfotipos considerados previamente como especies diferentes, como es el caso de *Alexandrium ostenfeldii* y *A. peruvianum* (Kremp et al., 2013). Por otro lado el desarrollo de herramientas moleculares ha permitido la identificación de genes responsables de la biosíntesis de toxinas y de las vías metabólicas implicadas, como el gen *sxtA4* en el género *Alexandrium* y los genes relacionados con la síntesis de toxinas del grupo de los poliéteres, dentro del cual se incluyen los azaspirácidos y el ácido okadaico (Snyder et al., 2003; Cembella & John, 2006; Stüken et al., 2011; Anderson et al., 2012b)

Aproximadamente un 6 % de las especies de dinoflagelados descritas posee la capacidad de producir ficotoxinas, las cuales abarcan un amplio espectro de sustancias de diferente naturaleza química, mecanismos de acción y actividad biológica (Gerssen et al., 2010). Las ficotoxinas pueden llegar al hombre a través de la cadena trófica, principalmente por su acumulación en bivalvos filtradores (Fig. 1.3), provocando respuestas letales o subletales, tales como trastornos gastrointestinales, de amnesia o neurológicos (Whittle & Gallacher, 2000). Las ficotoxinas se dividen comúnmente en hidrofílicas y lipofílicas de acuerdo a sus características químicas. Dentro del primer grupo se encuentran las toxinas responsables del envenenamiento a causa del Síndrome Paralizante de Moluscos (SPM), el cual ha generado mortandad de aves, peces y mamíferos marinos, e incluso la muerte de decenas de seres humanos en todo el mundo (Van Dolah, 2000). Entre ellas se encuentran las saxitoxinas y las gonyautoxinas producidas por el género *Alexandrium* y las especies *Gymnodinium catenatum* y *Pyrodinium bahamense*. El grupo de las toxinas lipofílicas reúne varios compuestos químicos de diferente naturaleza. Las consecuencias para los vertebrados, resultado de la ingesta de dichas toxinas, varían desde diarreas hasta daños neurológicos e incluso la muerte. Entre ellas se encuentran el ácido okadaico y las dinophysis toxinas (DTX), causantes del Síndrome Diarreico de Moluscos (SDM) y las pectenotoxinas, producidas por especies del género *Dinophysis* y *Prorocentrum lima*; las yessotoxinas, producidas por *Protoceratium reticulatum*, *Gonyaulax spinifera* y *Lingulodinium polyedrum*; los espirólidos producidos por *Alexandrium ostenfeldii*, los azaspirácidos, producidos por el género *Azadinium* y el ácido domoico, causante del Síndrome Amnésico de Moluscos (SAM), producido por diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* (Hallegraeff 2004; Lassus et al., 2016).

Durante las últimas décadas, los fenómenos de FANs han cobrado una connotación alarmante a nivel mundial debido a su aparente incremento espacio-temporal y a sus efectos devastadores en relación con la salud humana, con perjuicios económicos (relacionados principalmente con el recurso pesquero y la explotación de bivalvos), con episodios de mortandad de poblaciones naturales de peces, aves y mamíferos marinos, así como con el turismo (Dale et al., 2003; Hallegraeff, 2004; Hoagland & Scatista, 2006; Anderson et al., 2012; Clement et al., 2016).

A pesar de la complejidad de los fenómenos FANs se han postulado distintas causas posibles para explicar su incremento a nivel mundial, como:

- eutrofización antrópica producida por desechos industriales, domésticos y agrícolas y aumento de la utilización de aguas para acuicultura y granjas de moluscos, causando aumento de nutrientes en regiones costeras (Lam & Ho, 1989);
- condiciones hidroclimáticas inusuales, como las oscilaciones del Pacífico Sur causadas por el fenómeno “El Niño”, las cuales han sido relacionadas con floraciones de rafdoficeas y de *Pyrodinium bahamense* (Rhodes et al., 1993; MacLean, 1989);
- transporte de quistes de dinoflagelados y estatosporas de diatomeas en aguas de lastre de barcos, como sucedió con la introducción de *Gymnodinium catenatum*, de *A. catenella* y de *A. minutum* en Australia desde Japón y Europa; o asociados al transporte de moluscos de un área a otra, por ejemplo con el transporte masivo de ostras desde Japón a Europa en 1976 cuando se produjo un transporte de esporas de macroalgas invasoras de lagunas y aguas costeras (Lassus et al., 2016);
- impactos del cambio climático, incluyendo el calentamiento global, el cual mediante un aumento considerable en la temperatura superficial de mares y lagos, causa una disminución en el PH y cambios en la mezcla vertical, en las precipitaciones y las corrientes de upwelling (Van Dolah, 2000; Moore et al., 2008);
- impactos en las redes tróficas como resultado de la sobrepesca, producidos por la disminución de peces depredadores de pequeños peces, los cuales aumentan sus densidades poblacionales con la consecuente disminución del zooplancton, de manera que disminuye el

pastoreo sobre las microalgas, promoviendo sus floraciones (Lassus et al., 2016);

- incremento, no ya de los fenómenos en sí, sino del aumento de estudios sobre la problemática, lo cual evidencia la presencia de microorganismos tóxicos y de moluscos contaminados en sitios donde habían pasado desapercibidos (Hallegraeff, 1995, 2004; Lassus et al., 2016).

De cualquier manera, para probar fehacientemente que el incremento mencionado es real y no aparente, se requieren series históricas de datos de fitoplancton y de condiciones ambientales (Reguera, 2002).

En la Argentina, los episodios más importantes de FANs han estado tradicionalmente vinculados a la presencia de distintas especies de dinoflagelados (Carreto et al., 1981; Akselman, 2001; Gayoso et al., 2002; Sar et al., 2010). Entre ellas se destacan representantes del complejo de especies *Alexandrium tamarense*, productores de Toxinas Paralizantes de Moluscos (TPM), que han ocasionado severos daños en la salud pública, causando la muerte de varias personas, mortandad de peces y perjuicios económicos, así como la necesidad de imponer vedas a la recolección y comercialización de mariscos para prevenir daños mayores (Benavides et al., 1995; Montoya, 1997; Guzmán et al., 2002; Santinelli et al., 2002; Gayoso & Fulco, 2006). Asimismo, existen antecedentes de eventos de envenenamiento causado por Toxinas Diarreogénicas de Moluscos (TDM) en la provincia de Buenos Aires y de la detección de ácido okadaico y dinophysistoxina en bivalvos de la zona (Sar et al., 2010, 2012), lo cual ha llevado en varias oportunidades a la imposición de vedas al consumo y comercialización de moluscos, principalmente en la región norte de la provincia (Sunesen et al., 2014). Por otro lado los resultados de programas de monitoreo llevados a cabo en los Golfos norpatagónicos (San Matías, San José y Nuevo) arrojaron resultados positivos en bioensayos para TDM en moluscos (Gracia Villalobos et al., 2015). A su vez, se han detectado varias especies de *Azadinium*, un género toxígeno recientemente descrito a nivel mundial, en aguas adyacentes al talud continental (Akselman & Negri, 2012; Tillmann & Akselman, 2016). De la misma manera, también se han detectado en los últimos años nuevos grupos de ficotoxinas en muestras de plancton y moluscos de distintas zonas del Mar Argentino (Akselman et al., 2015; Krock et al., 2015; Turner & Goya, 2015). Sin embargo, aún no existen estudios que

analicen en forma global la ocurrencia de las distintas especies y sus respectivas toxinas en el área de estudio.

En este contexto el **objetivo general** de esta tesis doctoral es profundizar el conocimiento sobre la diversidad, la abundancia, la dinámica espacio-temporal y el perfil de toxinas de los dinoflagelados tóxicos presentes en distintas regiones del Mar Argentino, mediante un enfoque integrado que incluye análisis microscópicos, moleculares y toxinológicos.

Objetivos específicos

- Describir la abundancia y composición general del nano y microplancton en las distintas campañas de muestreo realizadas.
- Evaluar la presencia de las especies potencialmente tóxicas de dinoflagelados presentes en el área de estudio mediante estudios microscópicos y moleculares.
- Analizar la morfología celular de las especies tóxicas encontradas mediante técnicas de microscopía óptica y electrónica.
- Evaluar la abundancia y distribución de los dinoflagelados tóxicos en el área de estudio en relación con las concentraciones de ficotoxinas detectadas.

Estructura general de la tesis:

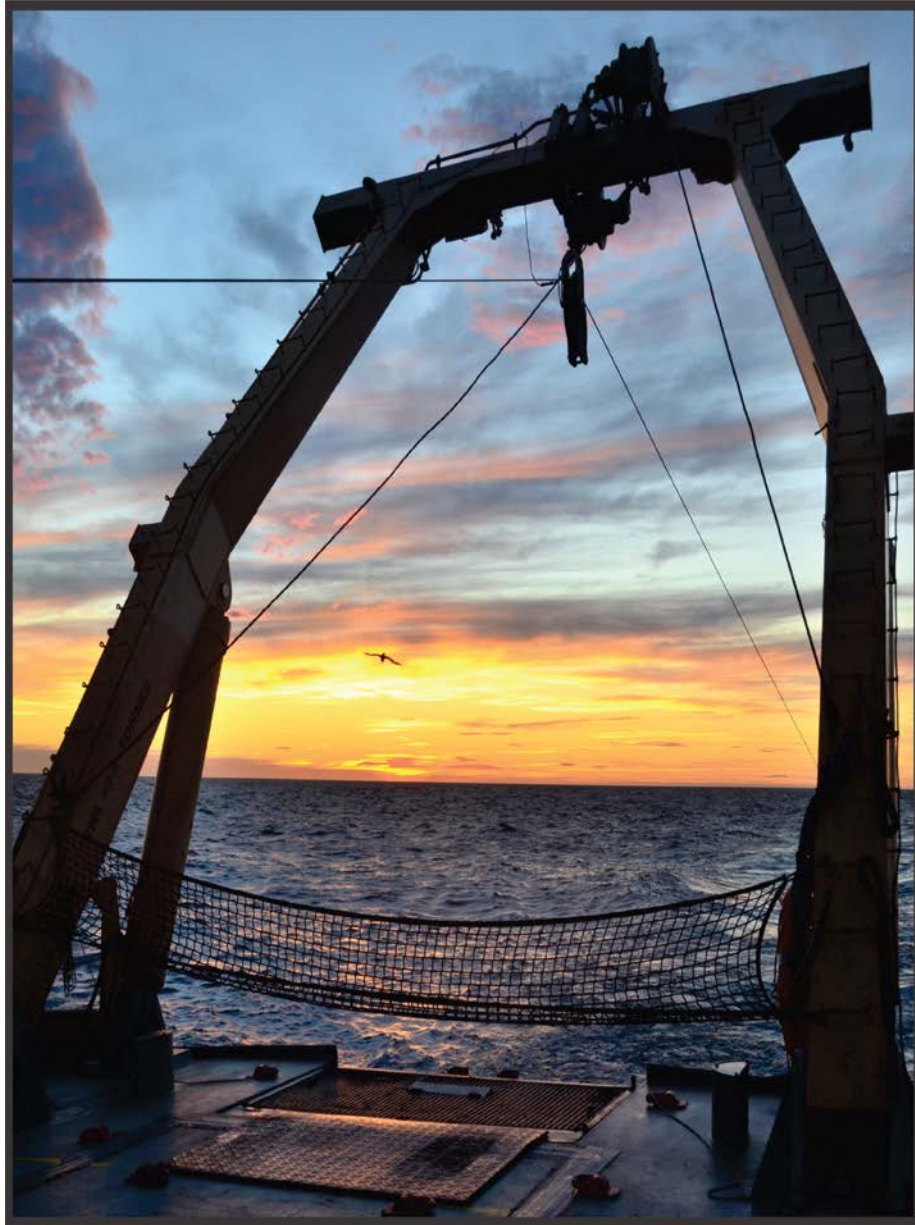
En el capítulo **Capítulo 2** se describe la metodología utilizada para la toma de muestras y su posterior tratamiento durante los análisis microscópicos, moleculares y toxinológicos.

En el capítulo **Capítulo 3** se presenta una descripción general de las comunidades planctónicas observadas durante las distintas campañas de muestreo, con especial énfasis en los grupos de dinoflagelados y diatomeas.

En los **capítulos 4 a 7** se presentan los resultados sobre la diversidad, morfología, abundancia y distribución de los géneros de dinoflagelados tóxicos encontrados y su asociación con los distintos tipos de toxinas detectadas.

Finalmente, en el **Capítulo 8** se presentan las conclusiones generales del trabajo.

Capítulo 2: Materiales y Métodos



2.1 Recolección de muestras

El área de estudio abarcó un extenso sector de la plataforma continental y el talud del Mar Argentino ($\approx 38\text{-}55^\circ\text{S}$) (Fig. 2.1), muestreado durante cuatro campañas oceanográficas llevadas a cabo en distintas estaciones del año (primavera, verano y otoño) entre los años 2012 y 2016, con un total de 121 puntos de muestreo.

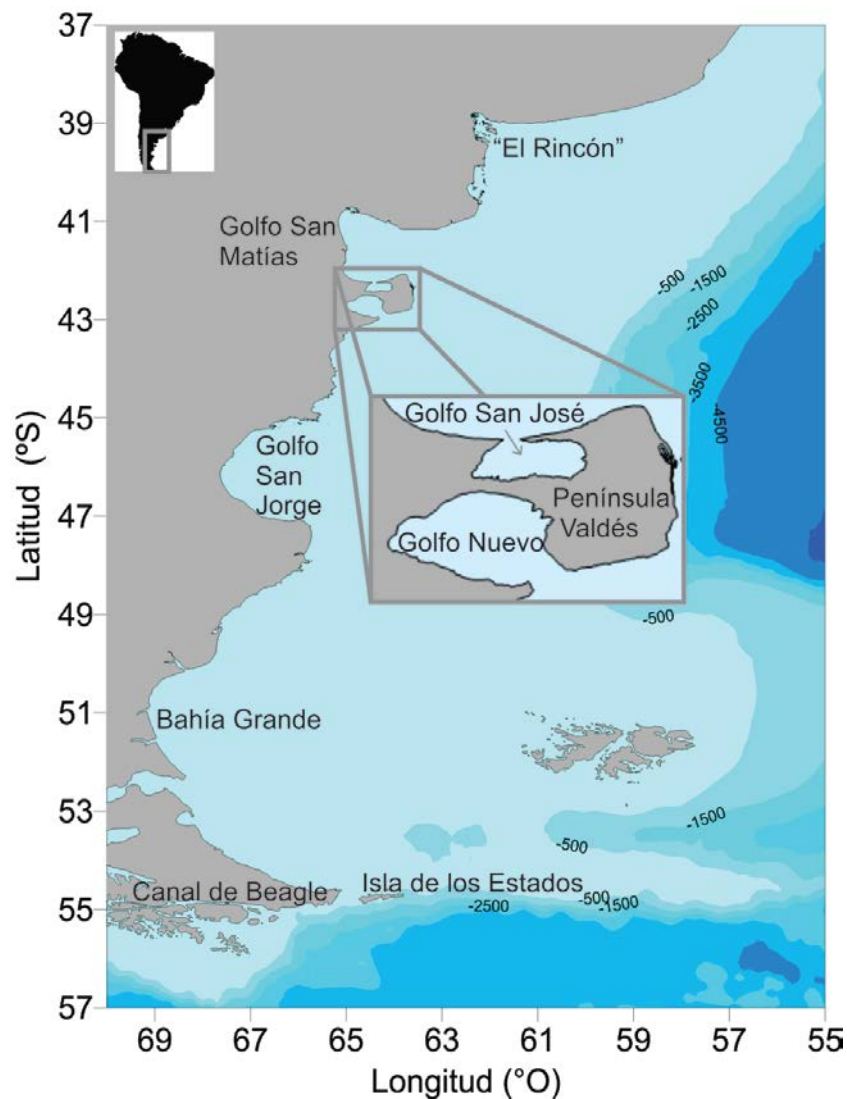


Fig. 2.1: Mapa del área de estudio indicando los principales accidentes costeros y la batimetría.

La primera campaña de muestreo, de aquí en adelante denominada “campaña de otoño” o “C1”, tuvo lugar a bordo del buque oceanográfico R/V “Puerto Deseado” desde el 30 de marzo hasta el 14 de abril del año 2012. Se realizaron muestreos en un total de 46 estaciones entre los ≈ 38 y los 55°S (Fig. 2.2).

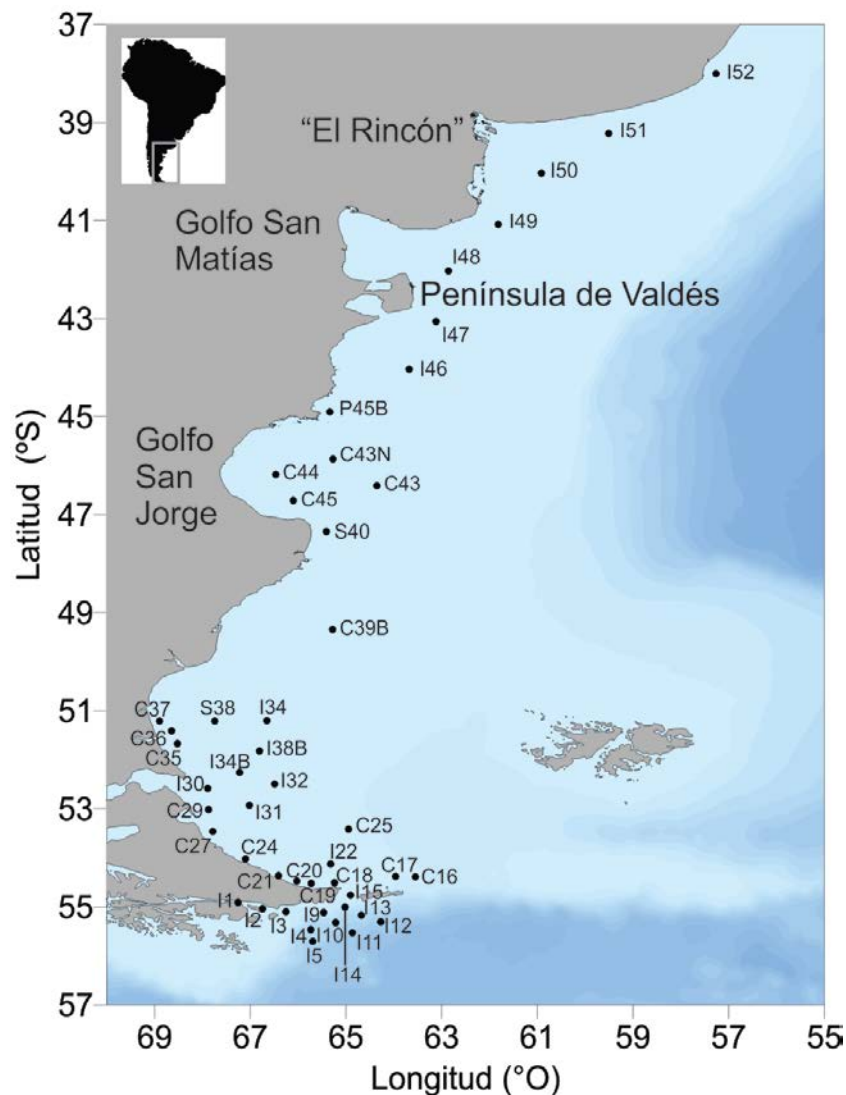


Fig. 2.2: Mapa del área de estudio indicando la posición y nombre de las estaciones de muestreo correspondientes a la campaña de otoño (C1).

La segunda campaña de muestreo, de aquí en adelante denominada “campaña de verano tardío” o “C2”, se realizó del 11 al 22 de marzo del año 2013 a bordo del buque oceanográfico R/V “Bernardo Houssay”. Constó de 24 estaciones de muestreo entre los ≈ 39 y los 43°S (Fig. 2.3). Estuvo dividida en dos piernas: la K1 que constó de 8 estaciones desde los 39 hasta los 40.7°S , y la K2 con 16 estaciones desde los ≈ 41 a los 43°S .

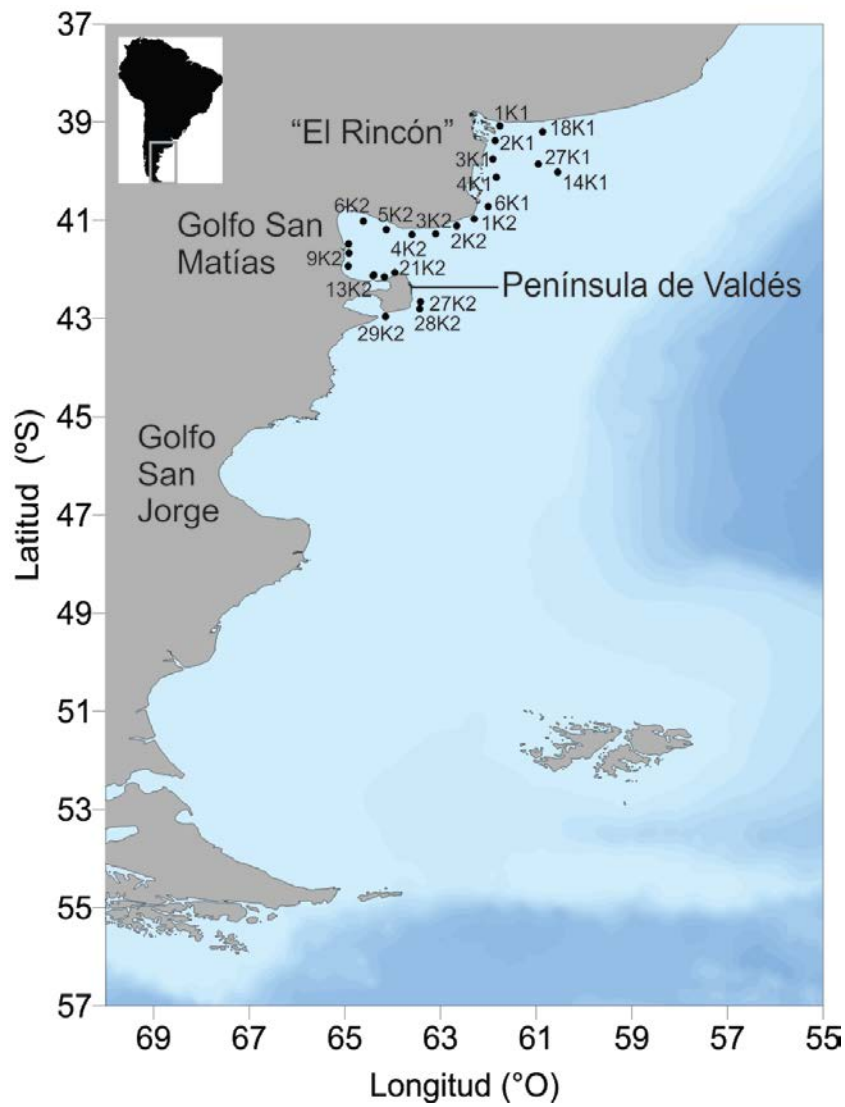


Fig. 2.3: Mapa del área de estudio indicando la posición y nombre de las estaciones de muestreo correspondientes a la campaña de verano tardío (C2).

La tercera campaña de muestreo, denominada en adelante “campaña de primavera” o “C3”, se llevó a cabo desde el 26 de octubre al 9 de noviembre del año 2013 a bordo del buque oceanográfico R/V “Puerto Deseado”. Se realizaron muestreos en 44 estaciones localizadas entre los ≈ 39 y los 47°S (Fig. 2.4).

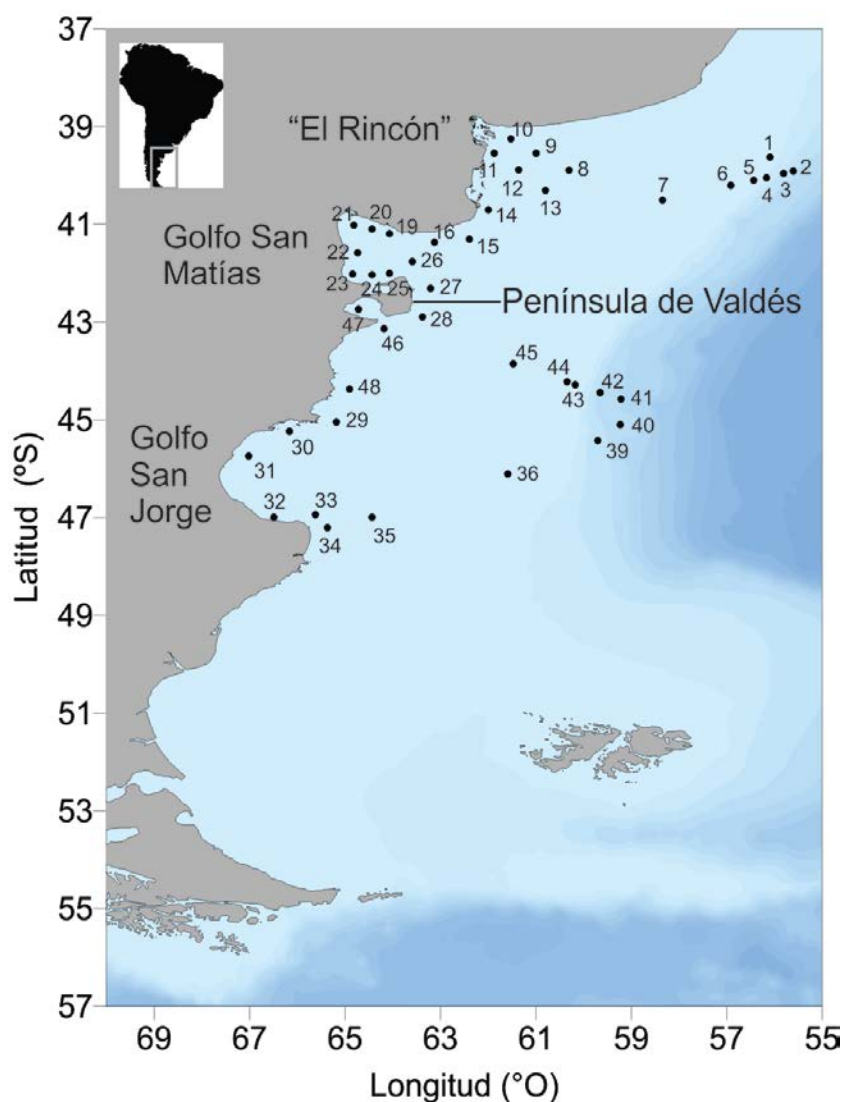


Fig. 2.4: Mapa del área de estudio indicando la posición y nombre de las estaciones de muestreo correspondientes a la campaña de primavera (C3).

La cuarta y última campaña, llamada en adelante “campaña de verano temprano” o “C4”, se llevó a cabo desde el 6 al 12 de enero de 2016, a bordo del buque oceanográfico “Bernardo Houssay”. Constó de un total de 7 puntos de muestreo (Fig. 2.5), dos de ellos localizados frente a Península de Valdés, tres al sur del Golfo San Jorge y los otros dos frente a la Isla de los Estados (Tierra del Fuego). Si bien la grilla de muestreo originalmente prevista para esta expedición constaba de 18 puntos de muestreo, por razones meteorológicas pudieron realizarse únicamente los siete antes mencionados.

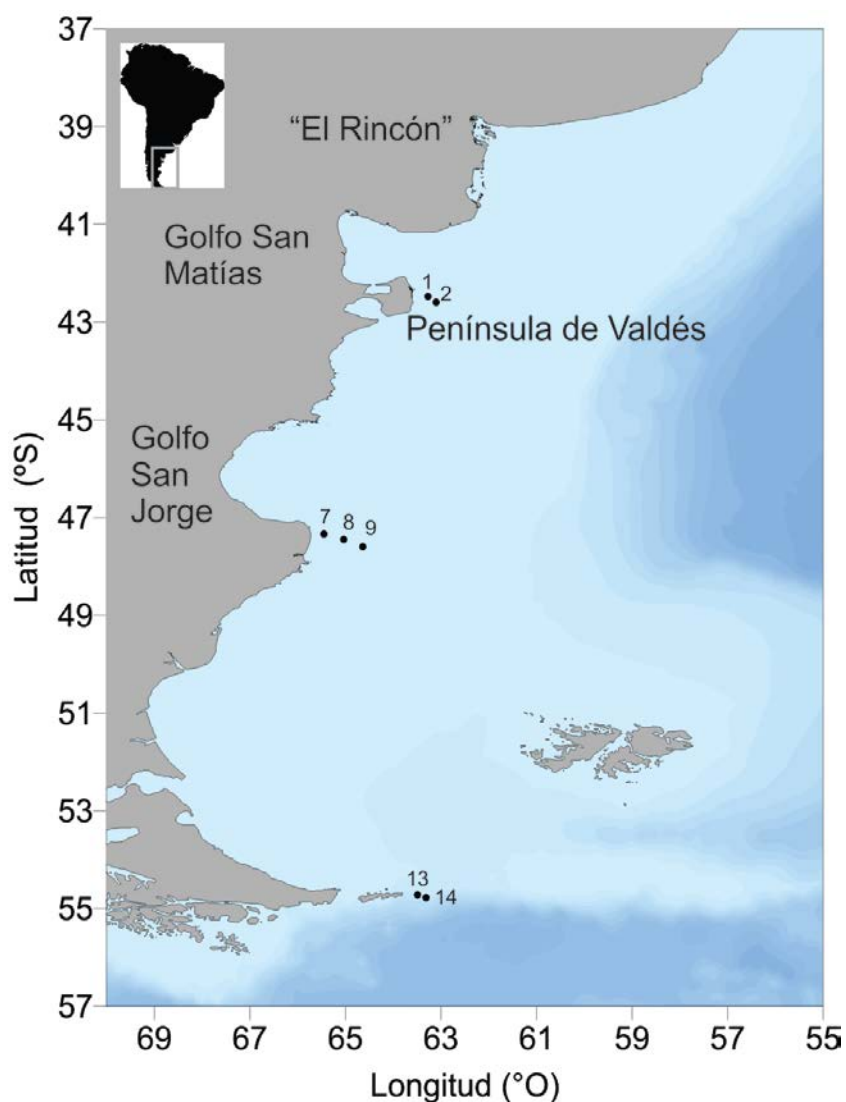
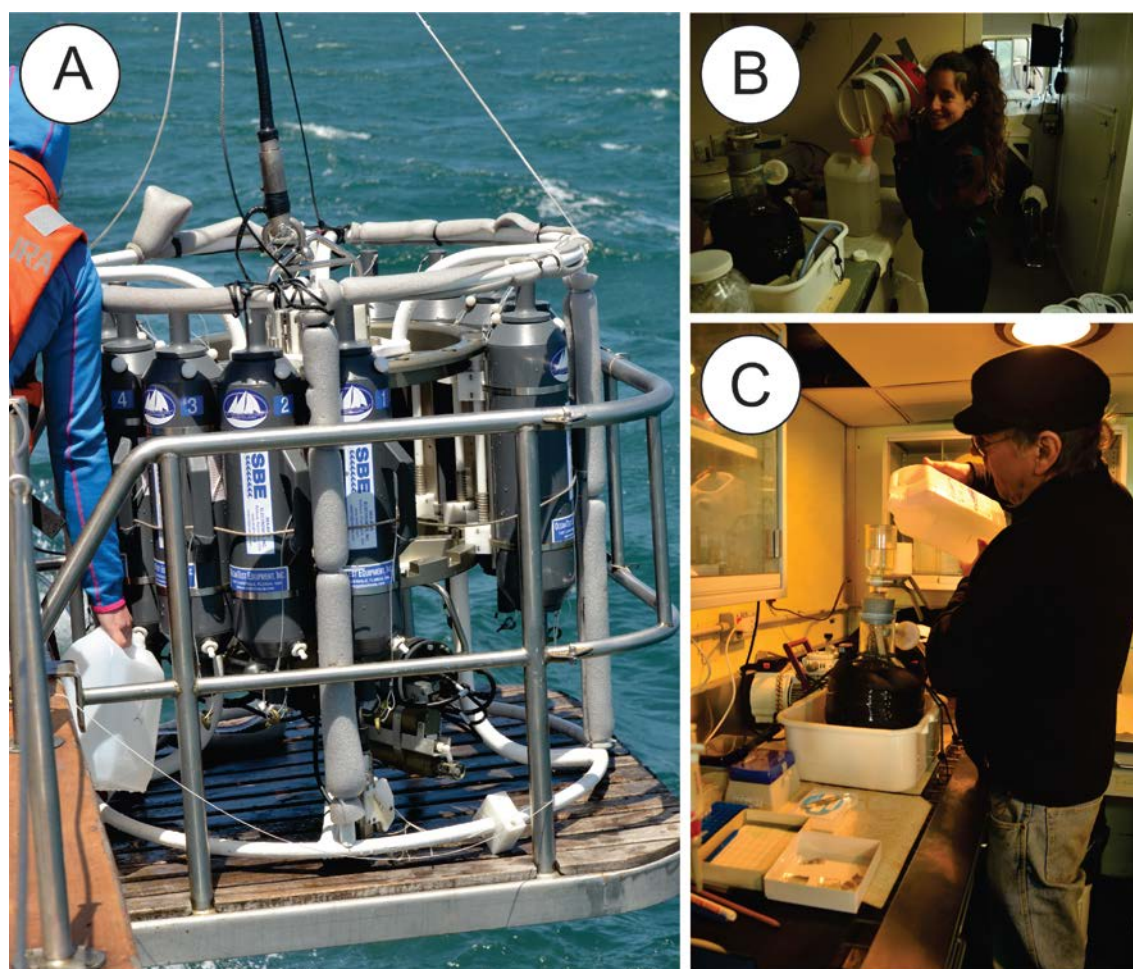


Fig. 2.5: Mapa del área de estudio indicando la posición y nombre de las estaciones de muestreo correspondientes a la campaña de verano temprano (C4).

En cada una de las campañas oceanográficas y para cada estación de muestreo se tomaron muestras cuantitativas y cualitativas para el análisis del nano y microplancton en forma simultánea con la toma de muestras destinadas al estudio de las ficotoxinas. En todas las expediciones se obtuvieron datos de salinidad, temperatura y profundidad (CTD), excepto en la pierna K2 de la C2, en la cual únicamente se midió la temperatura superficial con un sensor multiparamétrico TOA-DKK Modelo WQC.

Para la toma de muestras de botella se utilizó una roseta equipada con sensores de temperatura, salinidad, fluorescencia y botellas Niskin de 5 litros (Fig. 2.6 A). Las botellas se llenaron a 3 y 10 metros de profundidad y posteriormente se mezclaron 2,5 L de agua de cada profundidad (Fig. 2.6 B). De los 5 L obtenidos de la mezcla, 250 ml se fijaron con lugol acético (concentración final = 2%) para los análisis microscópicos de la comunidad planctónica y se mantuvieron en oscuridad y a temperatura ambiente hasta el momento de su análisis. El material restante se filtró con filtros de policarbonato de 5 μm de poro (Fig. 2.6 C) y los filtros se guardaron a -4°C para el análisis de azaspirácidos. Esto se debe a que los organismos productores de azaspirácidos se encuentran en un rango de tamaño entre 7 y 13 μm aproximadamente (Tillmann et al., 2009), por lo cual los análisis de toxinas no pueden realizarse con las muestras de red,



cuyo poro es de 20 μm .

Fig. 2.6: Fotografías tomadas durante la toma de muestras de botella. A) Roseta equipada con botellas Niskin de 5 L y equipo de CTD. B) Homogenización de agua de mar de 3 y 10 metros. C) Filtración.

Las muestras cualitativas se colectaron mediante arrastres verticales desde los 20 metros de profundidad hasta la superficie, utilizando una red de 20 μm de malla y 30 centímetros de diámetro (Fig. 2.7 A-B). Cada lance de red se llevó a un volumen total de 1 L agregando agua de mar filtrada con filtro de 5 μm de malla. Para el estudio morfológico e identificación de las distintas especies, alícuotas de 20 mL (C1) y 100 mL (C2-C4) fueron fijadas con lugol acético y mantenidas en la oscuridad y a temperatura ambiente hasta el momento de su análisis. La cantidad restante de muestra fue subsecuentemente filtrada por gravedad a través de un tamiz compuesto de tres mallas de Nitex de 200, 50 y 20 μm (Fig. 2.7 C-D). Luego el material colectado en cada malla fue resuspendido hasta un volumen final de 40 mL utilizando agua de mar filtrada y una piseta. El material obtenido de cada fracción de tamaño fue centrifugado en tubos Falcon de 45 mL durante 30 minutos a 3.000 x g. Los pellets resultantes de esta primera centrifugación (Fig. 2.7 F) fueron divididos en dos alícuotas iguales, destinadas al análisis de toxinas lipo- e hidrofílicas. Una vez realizada la división en alícuotas, las muestras fueron centrifugadas nuevamente en tubos de dos mL durante 15 minutos a 10.000 x g, a fin de continuar con su deshidratación. Los pellets obtenidos de la segunda centrifugación fueron guardados a -4°C para la extracción de toxinas. Durante la C1 no se obtuvieron muestras de red en las estaciones I12 e I13 debido a problemas meteorológicos.

Durante la C3 el material proveniente de la filtración por gravedad a través del tamiz fue resuspendido en 40 mL de agua de mar filtrada. A fin de obtener datos cuantitativos de los taxones toxígenos presentes en cada una de las fracciones de tamaño (20-50 μm , 50-200 μm , <200 μm), se separaron 10 mL de cada fracción y se fijaron con lugol acético para análisis microscópicos (Fig. 2.7 E). El material restante se dividió en tres alícuotas iguales de 10 mL, dos de las cuales se destinaron al análisis de toxinas, de la misma forma que en la C1, C2 y C4, mientras que la tercera alícuota fue destinada a análisis moleculares. Los pellets obtenidos fueron guardados en freezer a -80°C .

2.2 Análisis microscópicos

El análisis cuantitativo de las muestras de botella se realizó con el propósito de obtener información sobre la composición y abundancia de la comunidad planctónica en general y sobre la distribución de las especies y géneros toxígenos en particular. Para

ello se utilizó la técnica de Utermöhl (1958) y un microscopio invertido con contraste de fases Leica DMIL LED. Se dejaron sedimentar 50 ml de muestra de cada estación de muestreo durante 24 horas.

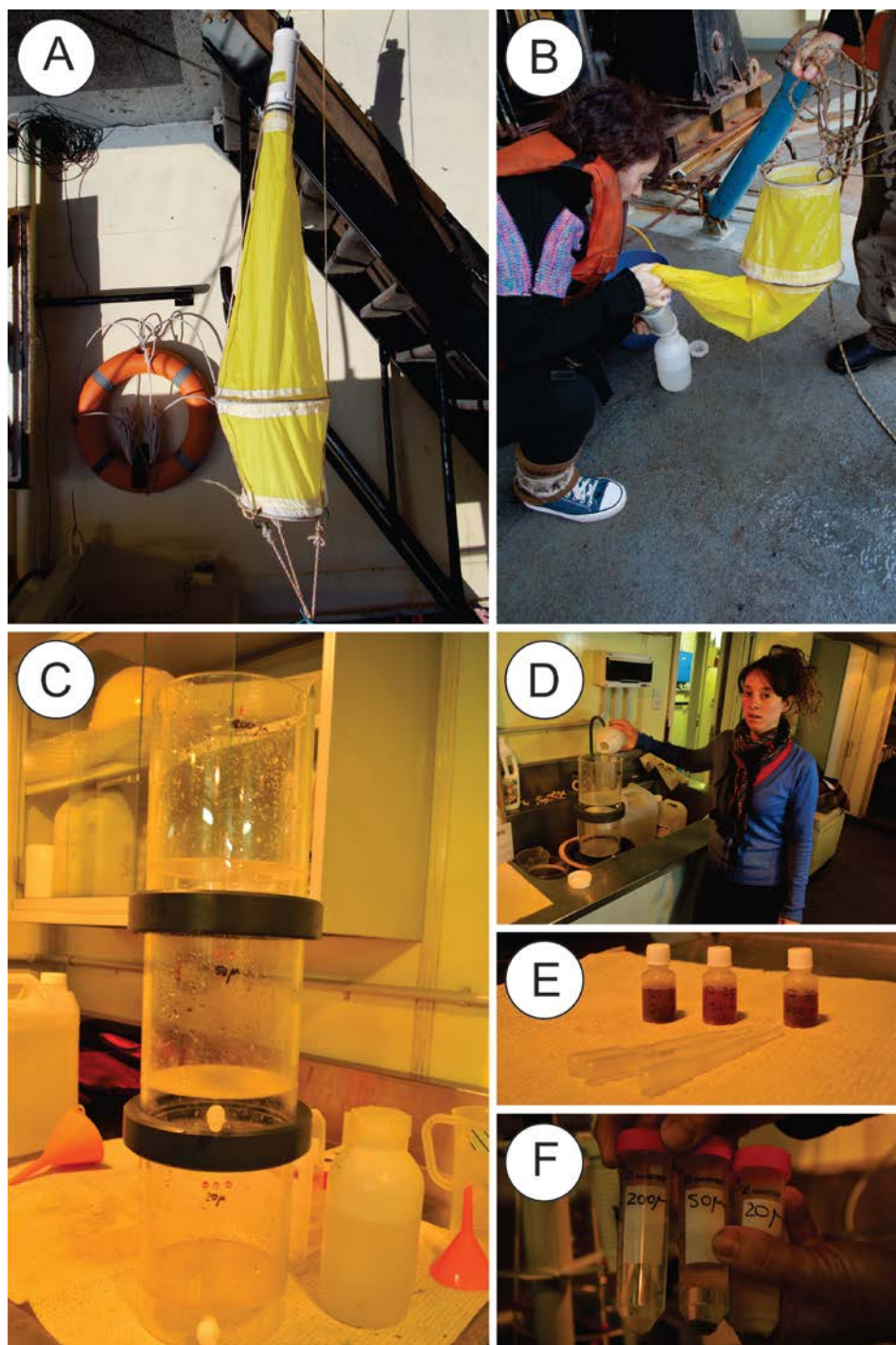


Fig. 2.7: Fotografías tomadas durante la toma de muestras cualitativas de red. A) red de fitoplancton utilizada durante los muestreos. B) recolección del material obtenido mediante el lance de red en un recipiente de 1 L. C) tamices utilizados para la filtración por gravedad y separación en fracciones de tamaño. D) proceso de filtrado por gravedad. E) muestras fraccionadas fijadas con lugol correspondientes a la C3. F) pellets resultantes de la primera centrifugación.

Para la cuantificación de los organismos se examinó la superficie total de la cámara de sedimentación o una cantidad variable de campos al azar (≥ 10), dependiendo de la cantidad de organismos presentes de los diferentes taxones. Los organismos dominantes y/o de pequeño tamaño (aproximadamente 10 μm) se contaron utilizando campos al azar con el aumento mayor (40X), y los organismos raros y/o de mayor tamaño se contaron en toda la cubeta utilizando aumentos menores (10 o 20 X). El límite de detección fue de 20 cél. L^{-1} .

Durante los recuentos celulares se consideraron representantes del nano y microplancton pertenecientes a los siguientes grupos: diatomeas, dinoflagelados, criptofíceas, haptofíceas, clorofíceas, silicoflagelados, prasinofíceas, euglenofíceas, ciliados y fitoflagelados no identificados menores a 10 μm . Por el contrario no se consideraron los representantes del zooplacton mayores a 200 μm .

Los análisis cualitativos de las muestras de red se realizaron con el objetivo de determinar a los representantes de dinoflagelados toxígenos hasta el menor nivel taxonómico posible. A tal fin se realizaron observaciones de alícuotas de muestra de cada estación mediante un microscopio de contraste de fase equipado con una lámpara de epifluorescencia y uno de contraste de interferencia modelo Leica DM2500, ambos equipados con una cámara DFC420C. Asimismo se elaboraron preparados fijos montados en Naphrax según Ferrario et al. (1995), los cuales se incluyeron en la Colección de la División Ficología “Dr. Sebastián Guarrera” del Museo de La Plata (LPC 15256-15376). Para ello se tomaron dos alícuotas de aproximadamente 3 mL de cada muestra. Ambas alícuotas se lavaron entre 4 y 6 veces con agua destilada para remover el fijador. Una de ellas fue montada en Naphrax y la otra se trató con peróxido de hidrógeno para el estudio de los frústulos limpios de diatomeas. Luego de una nueva serie de lavados también se montaron en Naphrax.

Para el estudio taxonómico detallado de los dinoflagelados se observaron alícuotas teñidas con CalcoFluor utilizando microscopía de epifluorescencia UV, de acuerdo a Fritz & Triemer (1985). En particular, para el análisis taxonómico del género *Alexandrium* la teca celular fue separada del citoplasma utilizando hipoclorito de sodio y un punzón (Boltovskoy, 1995), a fin de facilitar el análisis de la tabulación y de la forma y tamaño de las placas diagnósticas.

Los análisis ultraestructurales se realizaron utilizando un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6360 LV del Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) del Museo de La Plata, un microscopio electrónico de barrido Carl Zeiss

NTS (SUPRA 40) del Centro de Microscopías Avanzadas (CMA) de la Universidad de Buenos Aires y un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta FEG 200 perteneciente al Alfred Wegener Institute (AWI), Bremerhaven, Alemania. Dado el pequeño tamaño de las células de *Azadinium* ($\approx 7\text{-}18\ \mu\text{m}$), estas generalmente no quedan retenidas en las muestras de red. Por lo tanto, para su estudio taxonómico se utilizaron concentrados de muestras de botella. En los casos en los que la abundancia celular superó las $\sim 10^5\ \text{cél. L}^{-1}$ se sedimentaron 50 mL de muestra durante 24 hs y el material sedimentado se filtró a través de filtros de poliamida de $0,45\ \mu\text{m}$ de poro, mientras que en muestras con menor densidad celular las células fueron aisladas individualmente mediante una micropipeta y concentradas en crioviales hasta su posterior filtración. En ambos casos, el material fue deshidratado a través de series de diluciones de etanol (25, 50, 75, 100%) para ser analizado mediante MEB. Los organismos retenidos en los filtros fueron luego secados empleando la técnica de punto crítico (Boltovskoy, 1995), para el caso de las muestras observadas en el Museo de La Plata y el CMA, y la técnica de deshidratado con hexamethyldisilazane (Tillmann et al., 2009), para materiales analizados en el AWI. En ambos casos, el filtro fue metalizado con oro previo a su observación al MEB. Para los análisis del género *Alexandrium* realizados con MEB se aplicó la misma metodología de deshidratación detallada previamente.

Adicionalmente, con el propósito de analizar la relación entre la densidad celular de dinoflagelados potencialmente toxígenos y la concentración de toxinas, se realizaron recuentos celulares de alícuotas de 1 mL de las muestras de red utilizando cámaras Sedgewick-Rafter (LeGresley & McDermott, 2010) en un microscopio invertido con contraste de fases Leica DMIL LED. Para la cuantificación de los organismos se examinó la superficie total de la cámara utilizando un aumento de 10 X, o una cantidad variable de campos al azar (≥ 10) utilizando un aumento de 20 X, dependiendo de la cantidad de organismos presentes de los diferentes taxones. Las densidades estimadas se expresan en los capítulos siguientes como células por lance de red (cél. LR^{-1}). El grado de asociación entre células y toxinas se estableció mediante el índice de correlación de Spearman aplicando el software Statistica 7.1.

2.3 Análisis de toxinas

Para el análisis de toxinas lipofílicas los pellets obtenidos de las muestras de red se resuspendieron en 500 μL de metanol y homogeneizaron junto con 0,9 g de matriz lítica D (esferas pequeñas utilizadas para la ruptura de paredes celulares) utilizando un homogeneizador por batido Bio101 FastPrep a 6.5 m s por 45 s. Luego de la homogenización, las muestras fueron centrifugadas a 16.100 x g a 4 °C por 15 min. Los sobrenadantes fueron transferidos a filtros de centrifugación de 0.45 μm de poro (Millipore Ultrafree, Eschborn, Alemania) y centrifugados durante 30 s a 800 x g. Por último, los filtrados se transfirieron a viales para su análisis con cromatografía líquida (HPLC) acoplada con espectrometría de masa en tándem (MS-MS), como se describe en Krock et al. (2008b). Los grupos de ficotoxinas incluidos en los análisis fueron los siguientes: gimnodiminas, espirólidos, pinnatoxinas, ácido okadaico y dinophysistoxinas, pectenotoxinas, yessotoxinas y azaspirácidos.

El análisis de toxinas hidrofílicas (TPM) se realizó luego de la separación de analitos en modo de fase reversa con cromatografía líquida de alta eficacia por derivación post-columna y detección fluorescente, de acuerdo al método descrito en Krock et al. (2007). La determinación de perfiles en el caso de las toxinas hidrofílicas se realizó únicamente en las muestras que presentaron un valor igual o mayor a 1,5 ng LR⁻¹. Este valor se eligió teniendo en cuenta que los diferentes límites de detección de las toxinas individuales pueden influir en el perfil, especialmente porque el método tiene una sensibilidad claramente inferior para la detección de GTX1/4 que para las otras toxinas hidrofílicas.

Los datos se presentan como nanogramos detectados por lance de red (ng LR⁻¹).

Los análisis de toxinas se realizaron en colaboración con el Dr. Bernd Krock y su grupo de trabajo en el Departamento de Química Ecológica del “Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research” (AWI) de Bremerhaven, Alemania.

2.4 Estimación de cuotas celulares

Con el propósito de estimar las cuotas celulares de toxinas, entendidas como la cantidad promedio de toxina presente en una célula de determinado taxón, se utilizaron

los resultados de los recuentos celulares de las distintas especies potencialmente tóxicas y los de análisis de toxinas, realizados a partir de muestras de red. A tal fin se realizó el cociente entre el contenido de toxinas y el número de células para cada estación de muestreo. Sólo se estimaron cuotas celulares de toxinas en las estaciones de muestreo en las cuales se encontró una única especie potencialmente productora de la toxina en cuestión o, en el caso de haber más de un productor potencial, las cuotas se calcularon sólo cuando una de las especies representó al menos el 90% del total de células de los productores potenciales.

De acuerdo a las recomendaciones reportadas por el Consejo Internacional para la Exploración del Mar (en inglés: International Council for the Exploration of the Sea, ICES) (ICES, 2006), sólo se estimaron cuotas celulares para aquellas muestras en las que se contaron más de 10.000 células por litro de muestra de red del taxón tóxico a considerar en las cuotas celulares.

En las campañas C1, C2 y C4, en las cuales las muestras de red para el estudio del nano y microplancton no se dividieron en fracciones de tamaño, la asociación entre las especies tóxicas y los distintos grupos de toxinas presentes en las diferentes fracciones de tamaño (20-50, 50-200) se realizó acorde a sus dimensiones celulares. Por el contrario, en la C3, en la cual las muestras de nano y microplancton se dividieron en las mismas fracciones de tamaño que las muestras de toxinas, se asoció la densidad celular y contenido de toxinas directamente para cada fracción. Las toxinas presentes en la fracción >200 μm no fueron consideradas en la estimación de cuotas celulares ya que no existen dinoflagelados tóxicos mayores a 200 μm . En el caso particular de la estimación de cuotas celulares de TPM para especies de *Alexandrium* durante la C3, se utilizaron los conteos celulares y datos de concentraciones de toxinas de las fracciones de 20-50 μm y de 50-200 μm sumados. En este caso las cuotas fueron calculadas para células del género *Alexandrium* (sin discriminar especies) debido a la dificultad que presenta la diferenciación entre las dos especies productoras de TPM (complejo *A. tamarense* y *A. aff. minutum*) durante los conteos celulares.

Las cuotas celulares de toxinas se expresan en los capítulos siguientes como picogramos de toxina por célula (pg cél.^{-1}).

2.5 Análisis moleculares

Con el propósito de detectar molecularmente a las distintas especies de *Alexandrium* presentes en la comunidad planctónica, se aplicaron ensayos de qPCR a un total de once muestras, correspondiente a las fracciones de tamaño de 20-50 μm de las estaciones 2-7, 9, 14, 27, 43 y 44 de la C3, como se describe en Toebe et al. (2013). A causa de posibles deficiencias en las condiciones de traslado de las muestras se produjo una degradación considerable del ADN del fitoplancton en el resto de las muestras colectadas en la C3, mientras que las once muestras antes mencionadas presentaron suficiente ADN intacto como para poder realizar los análisis moleculares, los cuales se llevaron a cabo en colaboración con el Dr. Uwe John, del Departamento de Química Ecológica del AWI.

2.5.1 PCR de muestras de campo

La extracción del ADN se realizó utilizando el kit comercial NucleoSpin Plant II. Posteriormente, el material obtenido se amplificó y cuantificó por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como se describe en Toebe et al. (2013), la cual fue aplicada con la intención de detectar y diferenciar especies pertenecientes al género *Alexandrium* presentes en las muestras, ya que la calidad del ADN no permitió una cuantificación del material genético.

Para cada reacción se utilizó 1 ng de ADN extraído. El extracto de ADN proveniente de las muestras ambientales se diluyó a 1 ng de ADN por reacción. Todos los experimentos de qPCR se llevaron a cabo por triplicado en un equipo StepOnePlus Real Time PCR (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania) en un volumen final de 10 μL conteniendo 5 μL del pack: 2x TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania). Las condiciones del ciclado se detallan a continuación: Etapa 1, 50 °C durante 2 min, Etapa 2: 95 °C por 20 s, seguido por 40 ciclos de la Etapa 3: 95 °C por 1 s, 60 °C por 20 s.

Se realizaron series de diluciones estándar para las especies de *Alexandrium* con ADN genómico de un concentrado celular conocido, las cuales fueron diluidas desde 10 ng a 10 fg. Se agregaron los marcadores moleculares a una concentración final de 900 nM cada uno y las sondas TaqMan MGB se etiquetaron con 6FAM (6-carboxifluoresceína) a una concentración final de 200 nM. Los ensayos TaqMan

específicos para tres especies del complejo *Alexandrium tamarense* (Grupo I, Grupo II; y Grupo III), *Alexandrium tamutum* y *Alexandrium minutum* se realizaron como se describen en Toebe et al. (2013). El ensayo para *Alexandrium ostenfeldii* y para el Grupo IV del complejo *A. tamarense* se realizó de acuerdo a Elferink et al. (2016).

2.5.2 PCR de células aisladas y análisis filogenéticos

El aislamiento de células del género *Alexandrium* se realizó por medio de un microscopio invertido (Axiovert 200 M, Zeiss, Alemania) con una magnificación de 200x. Un total de 16 células fueron aisladas al azar a partir de la muestra de red correspondiente a la fracción de 20 a 50 µm de la estación 27 de la C3. Para la amplificación del ADN las muestras se incubaron durante 10 minutos a 95 °C y luego se congelaron nuevamente. Luego de descongelar se añadió la mezcla de PCR con los siguientes cebadores para la amplificación: D1R-F (5-ACC CGC TGA ATT TAA GCA TA- 3) y D2C-R (5-CCT TGG TCC GTG TTT CAA GA- 3). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: HotMasterTaq® (5Prime, Hamburgo, Alemania) buffer 1X, 0.1 mM de dNTPs, 0.1 mM y 1.25 unidades de polimerasa Taq (adidasadas con el fin de colectar las células), en un volumen total de 50 µL. Las reacciones fueron desarrolladas en condiciones de ciclos térmicos: un ciclo de 95 °C por 7 min; 35 ciclos a 94 °C por 45s, 54 °C por 2 min, 70 °C por 1.5 min; y una extensión final a 70 °C por 5 min.

Las amplificaciones resultantes fueron subsecuentemente clonadas en un vector pCR®2.1-TOPO® de acuerdo con el protocolo del kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Posteriormente se aislaron y secuenciaron de tres a seis clones por amplificación de ambos extremos utilizando química de secuenciación estándar en un secuenciador capilar ABI 3130 XL (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania) con los cebadores universales suministrados por el kit. Después de la eliminación de secuencias de vector y cebador, las secuencias de avance y retroceso se ensamblaron con CLC Main Workbench 7 (www.clcbio.com) y las secuencias fueron asignadas a especies utilizando el software blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Las secuencias de *Alexandrium* confirmadas se incluyeron en la alineación de John et al. (2014). Análisis filogenéticos de máxima probabilidad del set D1-D2 LSU rDNA se llevaron a cabo mediante MEGA versión 6 (Tamura et al., 2013) utilizando el siguiente parámetro (GTR G+I y 1000 replicaciones de bootstrapping) y la alineación descrita en John et al (2014). Para simplificar el análisis, la alineación se basó en la

secuencia filtrada de cepas de *Alexandrium*, a fin de eliminar las secuencias con diferencias de ≤ 2 pb, y una secuencia representativa de cada una se seleccionó para su inclusión en el análisis filogenético. Este procedimiento de filtrado capturó la mayoría de la variación dentro de cada especie mientras que se redujo el número total de secuencias en el análisis para todas las especies (de 638 a 45). En los resultados cada secuencia representativa se denominó “ver.” y se le asignó un número y/o letra según lo indicado en John et al. (2014).

Capítulo 3: Abundancia y composición general del nano y microplancton



3.1 Introducción

La plataforma continental del Mar Argentino, con una planicie submarina de aproximadamente 10^6 km^2 , representa una de las más extensas del mundo y se distingue por su elevada productividad primaria y su vasto potencial pesquero (Bertolotti et al., 1996; Campagna et al., 2006). Las principales masas de agua que determinan sus características oceanográficas son el agua subantártica que fluye desde el norte del Pasaje de Drake a través de la Corriente del Cabo de Hornos, entre la costa Atlántica y las Islas Malvinas, y las corrientes de Malvinas y de Brasil, las cuales se extienden desde el Pasaje Drake hacia el norte y desde Brasil hacia el sur respectivamente, hasta confluir a lo largo del talud aproximadamente a los 40°S (Rivas et al., 2006). La corriente de Malvinas se caracteriza por presentar aguas de baja temperatura, alta salinidad y ricas en nutrientes, mientras que la corriente de Brasil posee aguas de mayor temperatura, menor salinidad y con bajo contenido de nutrientes (Acha et al., 2004). Así también el aporte de aguas de baja salinidad y alto contenido de nutrientes del Río de La Plata genera un frente termohalino al norte de la Provincia de Buenos Aires (Acha et al., 2004).

La distribución de la biomasa fitoplanctónica marina en la plataforma argentina está determinada principalmente por los ciclos de estratificación y mezcla de la columna de agua y por la existencia de frentes oceanográficos, como el frente permanente del talud y los frentes de marea estacionales en la boca de los Golfos San Matías y San Jorge, el frente de Península Valdés y la zona estuarina fría de Bahía Grande (Carreto et al., 1995; Acha et al., 2004; Rivas et al., 2006; Romero et al., 2006; Krock et al., 2015). En estas áreas, caracterizadas por una alta disponibilidad de nutrientes, se producen floraciones algales en diferentes épocas del año, las cuales ocurren cuando las tasas de crecimiento poblacional exceden a las de pérdida (Carreto et al., 2007). El aumento de la abundancia fitoplanctónica se encuentra regulado principalmente por factores ambientales como la irradiancia, la estabilidad de la columna de agua, la disponibilidad de nutrientes y la temperatura, mientras que las tasas de pérdida celular se deben en su mayoría al pastoreo, al agotamiento de nutrientes por consumo, a procesos de advección, y a la mezcla vertical de la columna de agua y el ataque de virus, entre otros (Miller & Wheeler, 2012). En consecuencia, la rápida acumulación de fitoplancton puede deberse a un aumento de los factores que promueven su crecimiento, a una

reducción de los que generan la caída de su abundancia o, lo que es más probable, a una combinación de ambos (Daniels et al., 2015).

Mediante estudios satelitales realizados en ciclos interanuales se han podido establecer patrones en la distribución y abundancia de la clorofila a lo largo de la plataforma del Mar Argentino. Por un lado, se observa una sucesión norte-sur en las concentraciones máximas, las cuales se detectan en la primavera temprana en el norte ($\sim 35-45^\circ\text{S}$) y en la primavera tardía y comienzos del verano en el sur ($\sim 45-55^\circ\text{S}$) (Rivas et al., 2006; Romero et al., 2006; Marrari et al., 2017). Por otro lado, la zona costera del sudoeste de la Provincia de Buenos Aires presenta valores máximos de clorofila en otoño e invierno, mientras que la zona de plataforma interna y media presenta picos en primavera (Delgado et al., 2015). Mediante análisis de biomasa y composición planctónica se observó la existencia de una sucesión anual en los grupos dominantes dentro de las comunidades fitoplanctónicas en sentido norte-sur, determinada principalmente por la progresión latitudinal y consecuente variación en irradiancia en el inicio de la floración en primavera, así como por las propiedades nutritivas de las masas de agua en el límite frontal de la Patagonia (Carreto et al., 2007, 2016). En este sentido, mediante mediciones satelitales de clorofila se han detectado regiones donde se producen floraciones recurrentes asociadas a la presencia de frentes bien definidos, como son la franja que se extiende desde los 38 a los 40°S en aguas de plataforma media, el talud desde los 37 a los 51°S , aguas adyacentes a Península Valdés, el Golfo San Jorge y la zona de Bahía Grande (Romero et al., 2006; Lutz et al., 2010).

En cuanto a la composición del plancton resultados previos indican que una comunidad generalmente dominada por nanoflagelados y relativamente pobre en diatomeas microplanctónicas se desarrolla sobre la plataforma durante gran parte del año (Carreto et al., 2003; Almandoz et al., 2007). La influencia de masas de agua con distintas características físico-químicas provenientes de las corrientes de Brasil y Malvinas promueve la presencia conjunta de especies de aguas cálidas, templadas y frías en esta zona, resultando en una elevada riqueza específica (Fernández & Brandini, 1999; Olguin & Alder, 2011). Las floraciones primaverales suelen comenzar con una dominancia de diatomeas. Luego se produce un declive de diatomeas debido a la escasez de nutrientes y los dinoflagelados comienzan a aumentar en número a causa de su capacidad de desplazamiento vertical en la columna de agua, lo que les permite acceder a los nutrientes acumulados en las capas más profundas (Smayda & Trainer, 2010.). Asimismo durante el verano se produce un cambio en los grupos dominantes y

hay un aumento en la abundancia de cocolitofóridos (García et al., 2011; Balch et al., 2014).

Durante un estudio reciente a lo largo del talud llevado a cabo durante la primavera se observaron diferencias entre las comunidades fitoplanctónicas presentes en la plataforma externa y las comunidades en el frente de talud. Mientras que las primeras se caracterizaron por una baja biomasa, alta diversidad y dominio de pequeños flagelados como haptofíceas y clorofíceas, las comunidades en el frente de talud presentaron altas biomásas y estuvieron dominadas por diatomeas centrales de pequeño tamaño (Carreto et al., 2016).

La amplia extensión latitudinal del Mar Argentino así como su extensa plataforma dificultan los estudios holísticos que brinden información general sobre la abundancia y composición del fitoplancton en distintas épocas del año. A continuación se presenta una breve descripción de los parámetros ambientales disponibles (temperatura y salinidad) y de la composición planctónica general observada a lo largo de cada una de las expediciones realizadas, a fin de poner en contexto los resultados sobre la ocurrencia de especies toxígenas de los capítulos posteriores.

3.2 Resultados

3.2.1 Campaña de otoño (C1)

Temperatura y Salinidad

La distribución de la temperatura del agua en superficie mostró un marcado gradiente latitudinal, con valores máximos de 19 °C al norte del área de estudio y mínimos de 6 °C al sur (Fig. 3.1). La salinidad presentó un gradiente desde los 49 hasta los 38 °S, con valores máximos de 34,2 al norte. Al sur de los 51 °S la distribución de la salinidad fue irregular, con un máximo de ~34,2 en el extremo sur del talud y mínimo de 31, 2 en el Canal de Beagle (Fig. 3.1).

Abundancia y composición planctónica

La abundancia total del nano y microplancton varió entre 1×10^5 y 23×10^6 cél. L^{-1} , con un promedio de 2×10^6 cél. L^{-1} . Los valores más altos, entre ~15 y 23×10^6 cél. L^{-1} , se observaron en tres estaciones al sur del área de muestreo, en zonas aledañas a Río Gallegos (Santa Cruz) y a Tierra del Fuego (Fig. 3.2). En el 80% de las estaciones,

incluyendo aquellas que presentaron las máximas abundancias, dominaron fitoflagelados no identificados de pequeño tamaño ($<10\ \mu\text{m}$) (Fig. 3.2). Por el contrario, en el Golfo San Jorge, donde los valores totales del nano y microplancton fueron bajos, se observó el predominio de dinoflagelados, principalmente del género *Tripos*, que alcanzó máximos celulares de $34.000\ \text{cél. L}^{-1}$.

En aguas adyacentes al golfo, tanto hacia el norte como hacia el sur, dominaron las diatomeas en abundancias entre 6.000 y $27.000\ \text{cél. L}^{-1}$. Los dinoflagelados presentaron generalmente durante esta campaña de muestreo abundancias inferiores a las $40.000\ \text{cél. L}^{-1}$ (promedio= $16.000\ \text{cél. L}^{-1}$) (Fig. 3.3). No obstante, en dos estaciones ubicadas al sur de la Provincia de Buenos Aires y frente a Península Valdés se observaron floraciones de *Prorocentrum cordatum* en densidades de hasta $200.000\ \text{cél. L}^{-1}$ y representando el 99% del total de dinoflagelados.

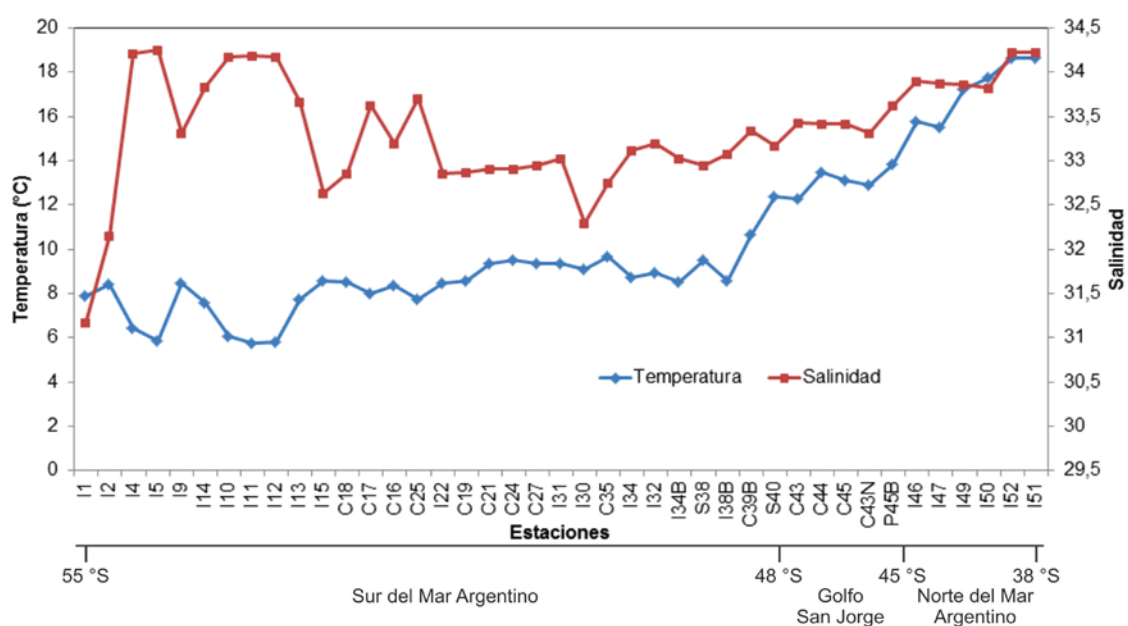


Fig. 3.1: Valores de temperatura y salinidad observados durante la C1.

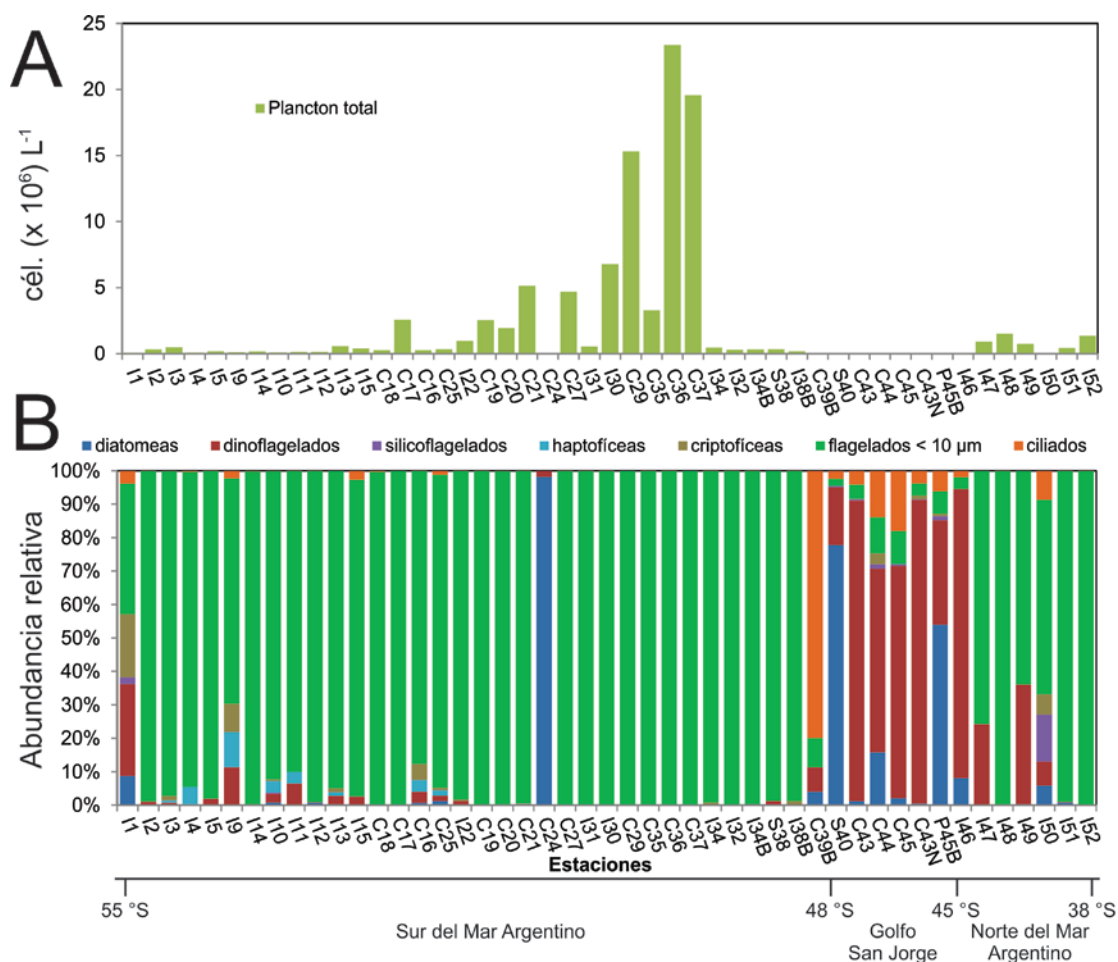


Fig. 3.2: (A) Abundancia del nano y microplankton total (cél. L⁻¹) y (B) abundancia relativa (%) de los diferentes grupos del nano y microplankton observadas en las muestras de botella durante la C1.

Las diatomeas mostraron en general abundancias inferiores a las de los dinoflagelados (promedio= 3.000 cél. L⁻¹) (Fig. 3.3). Las densidades máximas se encontraron cerca de la boca sur del Golfo San Jorge y en aguas de plataforma frente a Tierra del Fuego (≈54,5 °S). Las abundancias máximas las alcanzó el género *Rhizosolenia* (9.000 cél. L⁻¹) y diatomeas centrales de pequeño tamaño (≤15µm), con abundancias de 12.000 cél. L⁻¹.

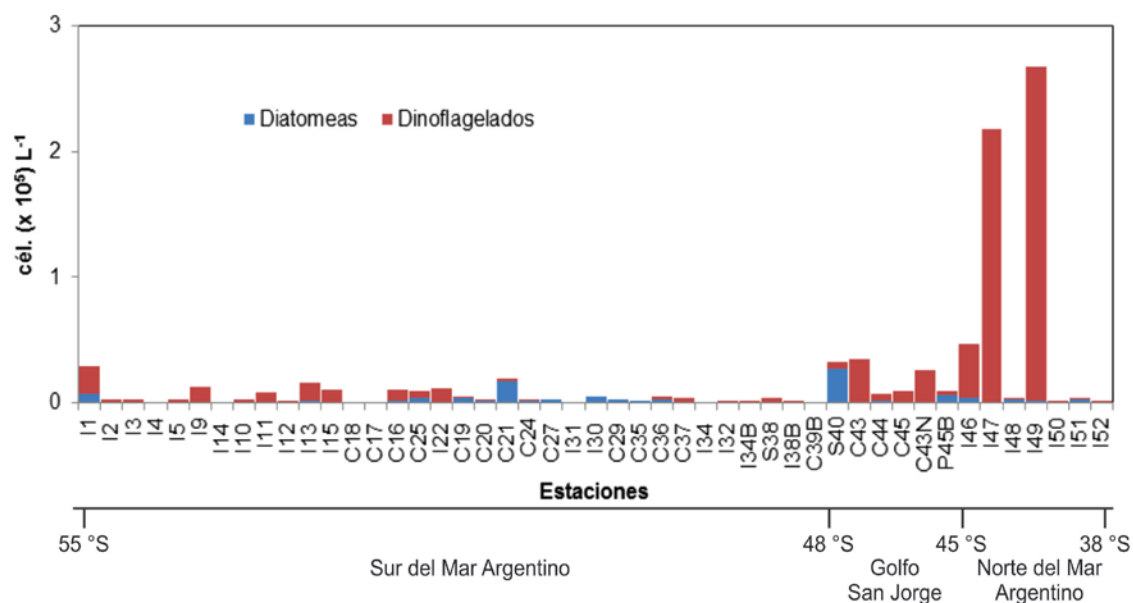


Fig. 3.3: Abundancia de dinoflagelados y diatomeas observada en muestras de botella durante la C1.

3.2.2 Campaña de verano tardío (C2)

Temperatura y Salinidad

La temperatura presentó un rango acotado, fluctuando entre 14 y 19 °C. Durante la K1 la salinidad presentó sus valores mínimos (31,9) en la zona de “El Rincón” y en la plataforma interna al sur de la Provincia de Bs As. y el máximo (34,1) en la estación más alejada de la costa (Fig. 3.4).

Abundancia y composición planctónica

La abundancia planctónica total varió entre 1×10^5 y 5×10^6 cél. L^{-1} , con un promedio de $0,5 \times 10^6$ cél. L^{-1} . Las densidades máximas se hallaron en la zona de El Rincón, al sur de la Provincia de Buenos Aires (Fig. 3.5). En estas estaciones se observó un claro dominio (> 80%) de fitoflagelados menores a 10 μm ; mientras que en el resto de las estaciones con predominio de este grupo sus abundancias relativas fueron inferiores (33 a 62%). En aguas adyacentes a Península Valdés y en una estación al sur de Provincia de Bs. As. se observó el predominio de criptofíceas (Fig. 3.5), las cuales además presentaron una alta frecuencia durante la campaña hallándose en el 80 % de las estaciones y alcanzando máximos celulares de 137.000 cél. L^{-1} .

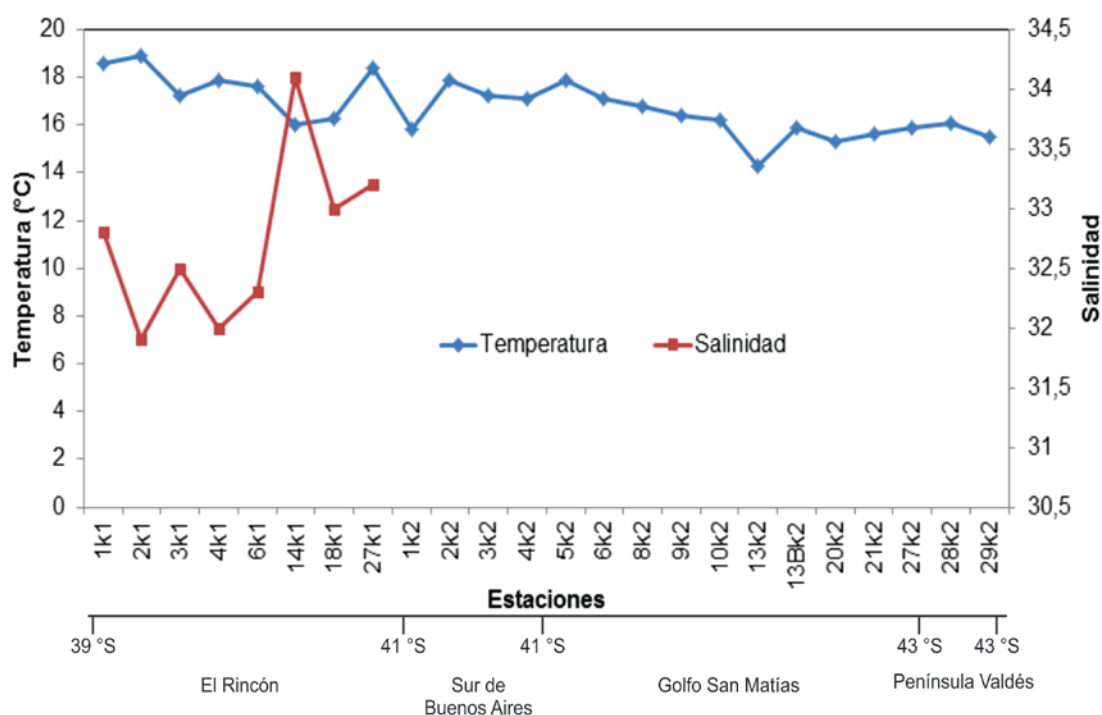


Fig. 3.4: Valores de temperatura y salinidad observados durante la C2.

La abundancia de dinoflagelados varió entre 60.000 y 126.000 cél. L⁻¹ (Fig. 3.6), con un promedio de 40.500 cél. L⁻¹. Las mayores abundancias se observaron en dos estaciones en aguas de plataforma interna, una correspondiente a la zona sur de El Rincón, (Pcia. de Buenos Aires) y otra al sur del Golfo San Matías. En El Rincón predominaron dinoflagelados atecados menores a 10 µm, con densidades de 126.000 cél. L⁻¹, mientras que en el golfo las máximas densidades (71.000 cél. L⁻¹) las alcanzó *Prorocentrum cordatum*.

En términos generales, las diatomeas mostraron abundancias semejantes a los dinoflagelados (promedio= 39.000 cél. L⁻¹), aunque presentaron un pico de 536.500 cél. L⁻¹ en la zona sur de El Rincón (Fig. 3.6), dado principalmente por altas abundancias de los géneros *Cerataulina* (300.000 cél. L⁻¹) y *Guinardia* (61.600 cél. L⁻¹).

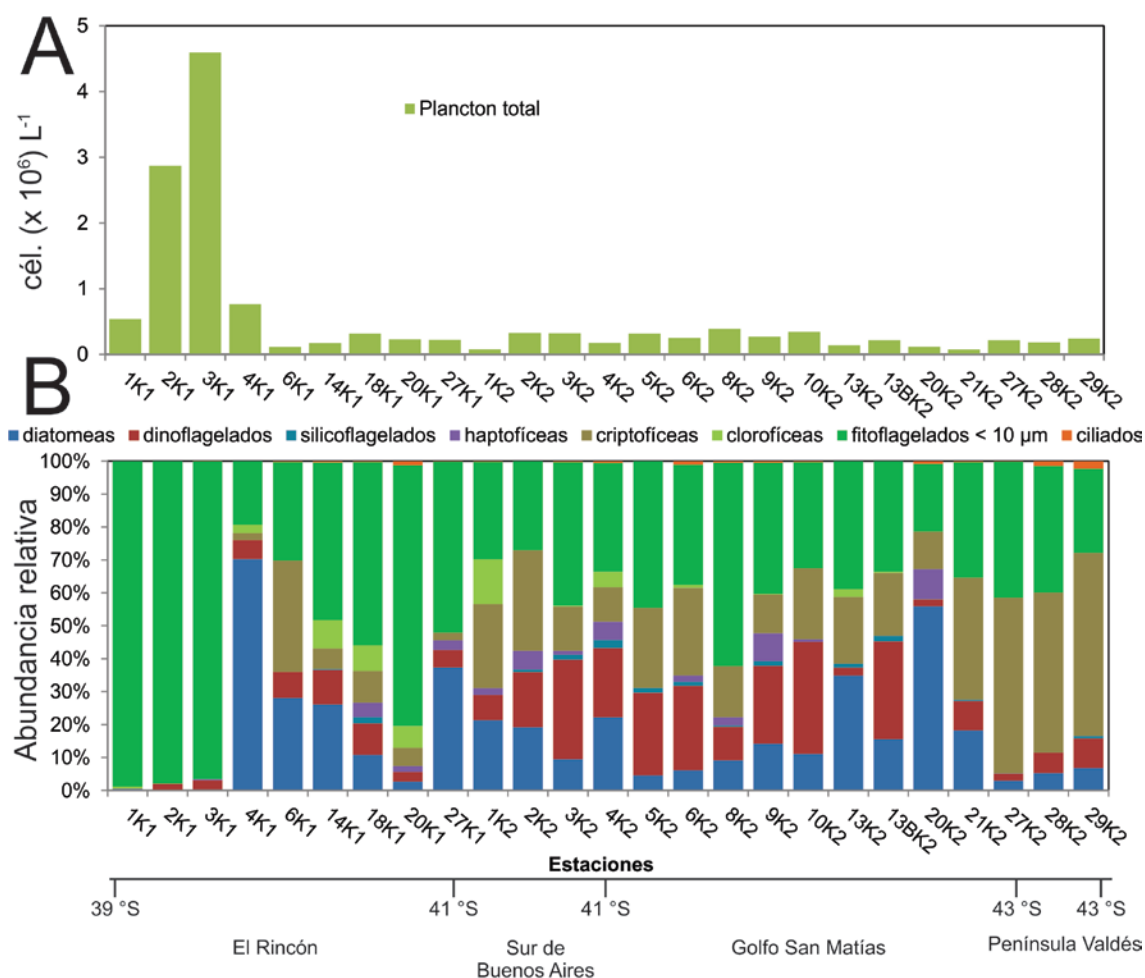


Fig. 3.5: (A) Abundancia del nano y microplankton total (cél. L⁻¹) y (B) abundancia relativa (%) de los diferentes grupos del nano y microplankton observadas en las muestras de botella durante la C2.

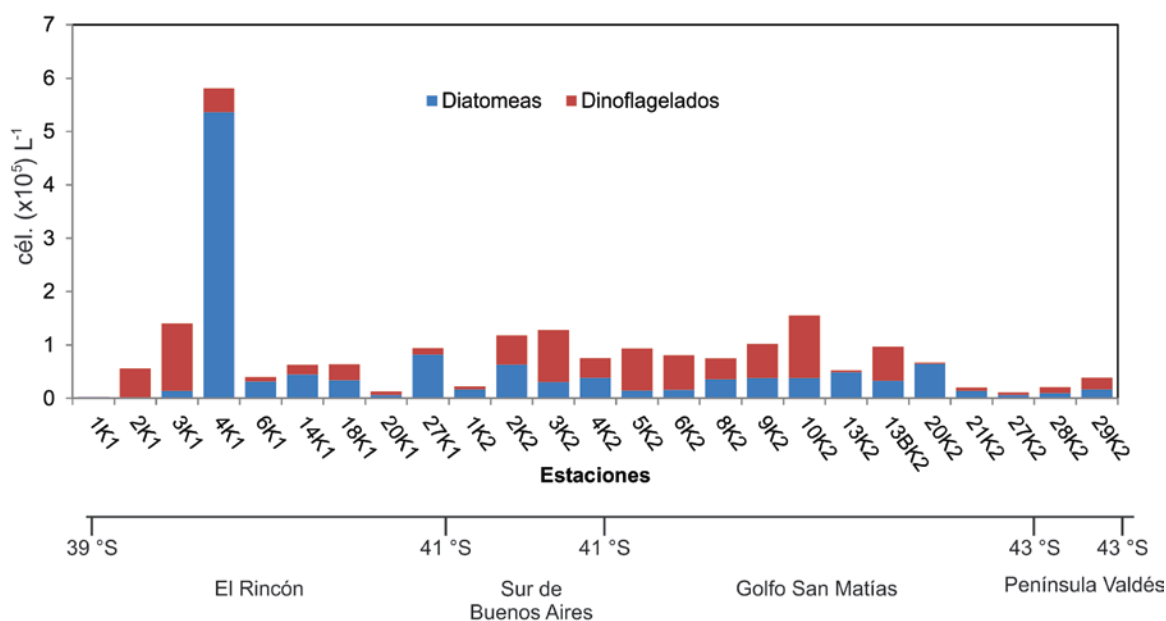


Fig. 3.6: Abundancia de dinoflagelados y diatomeas observada en muestras de botella durante la C2.

3.2.3 Campaña de primavera (C3)

Temperatura y Salinidad

La temperatura varió entre 7 y 15 °C, con valores mínimos en el talud a los ~45 °S y máximos en la zona de “El Rincón”. La salinidad fluctuó entre 32,9 y 34,2 con mínimos en la zona de El Rincón y aguas adyacentes a la boca sur del Golfo San Jorge y máximos en aguas del talud y en la zona norte del Golfo San Matías (Fig. 3.7).

Abundancia y composición planctónica

La abundancia planctónica total varió entre 1×10^5 y 27×10^6 cél. L^{-1} , con un promedio de $3,4 \times 10^6$ cél. L^{-1} . Se observaron dos picos principales de abundancia (20 - 27×10^6 cél. L^{-1}) en la zona de El Rincón (Fig. 3.8). En el 80 % de las estaciones, incluyendo las dos anteriores, dominaron los fitoflagelados menores a $10 \mu m$ (Fig. 3.8). Sin embargo, en un grupo de estaciones ubicadas en la zona norte y próximas al talud (~40 °S) se observó un marcado predominio de diatomeas (> 70%) con densidades variando entre 2 y 3×10^6 cél. L^{-1} . Por otro lado, también en aguas adyacentes al talud pero hacia el sur (~44°S), se observó una elevada abundancia relativa de dinoflagelados (> 90%), los cuales alcanzaron densidades de $1,5 \times 10^6$ cél. L^{-1} . Asimismo, al sur del Golfo San Matías y en aguas de plataforma interna a los 44 °S dominaron haptoficeas, representadas principalmente por *Phaeocystis* aff. *globosa* en densidades entre 2 y 3×10^6 cél. L^{-1} .

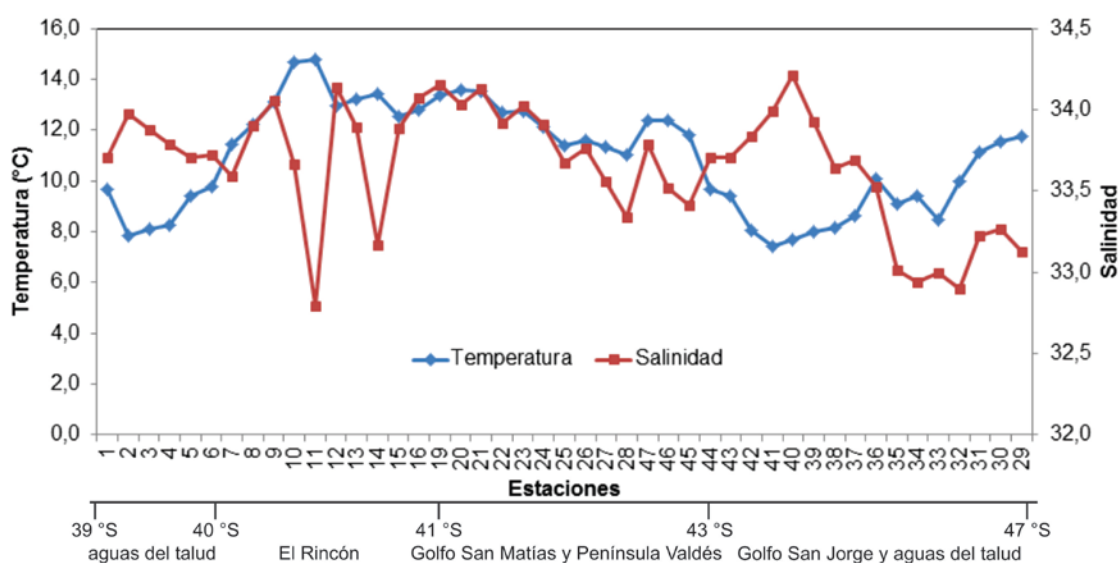


Fig. 3.7: Valores de temperatura y salinidad observados durante la C3.

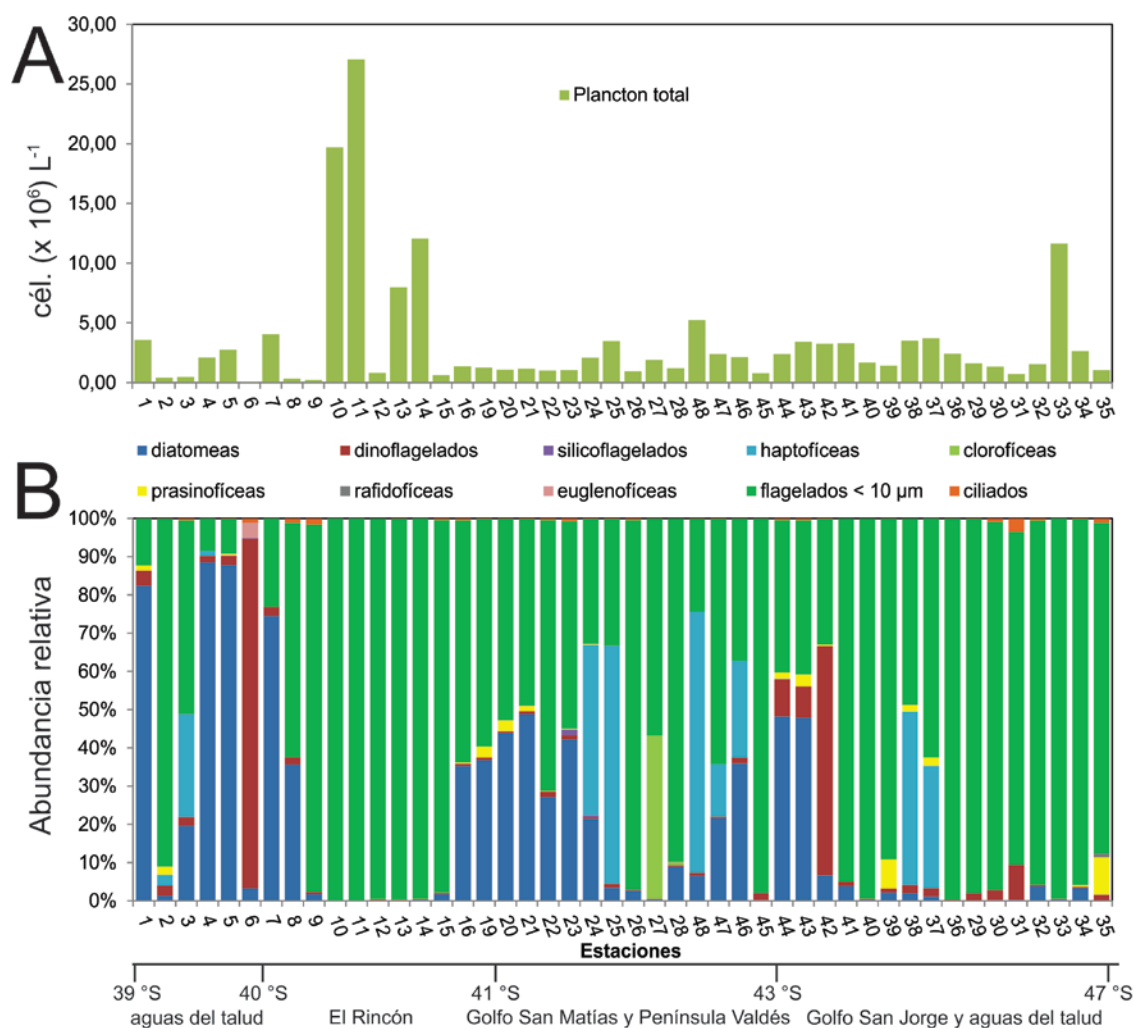


Fig. 3.8: (A) Abundancia del nano y microplankton total (cél. L^{-1}) y (B) abundancia relativa (%) de los diferentes grupos del nano y microplankton observadas en las muestras de botella durante la C3.

La abundancia de dinoflagelados varió entre 100 y $1,8 \times 10^6$ cél. L^{-1} , con un promedio de 77.000 cél. L^{-1} (Fig. 3.9). El pico máximo estuvo dado por una floración de *Prorocentrum cordatum* en el talud a los 44 °S, el cual representó la mayor abundancia de dinoflagelados observada durante este estudio. En la misma zona se observaron altas abundancias del género *Azadinium* (120.000 cél. L^{-1}), de atecados menores a 10 μm (40.000 cél. L^{-1}) y de *Gyrodinium* aff. *fuscus* (11.000 cél. L^{-1}). También en aguas cercanas al talud pero hacia el norte (40 °S), se observaron altas abundancias de los géneros *Azadinium* y *Protoperidinium*, presentando densidades de 29.000 y 20.000 cél. L^{-1} respectivamente, así como de atecados menores a 10 μm (28.500 cél. L^{-1}).

Las diatomeas superaron en abundancia a los dinoflagelados en casi todas las estaciones (Fig. 3.9), variando entre 80 y 3×10^6 cél. L^{-1} , con un promedio de 415.000 cél. L^{-1} . Las mayores abundancias se registraron en aguas adyacentes al talud, tanto al norte (40 °S) como al sur (44 °S), dadas por floraciones de una diatomea central de pequeño tamaño al norte y por el género *Hemiaulus* al sur, los cuales llegaron a alcanzar densidades de 2×10^6 y 1×10^6 cél. L^{-1} , respectivamente.

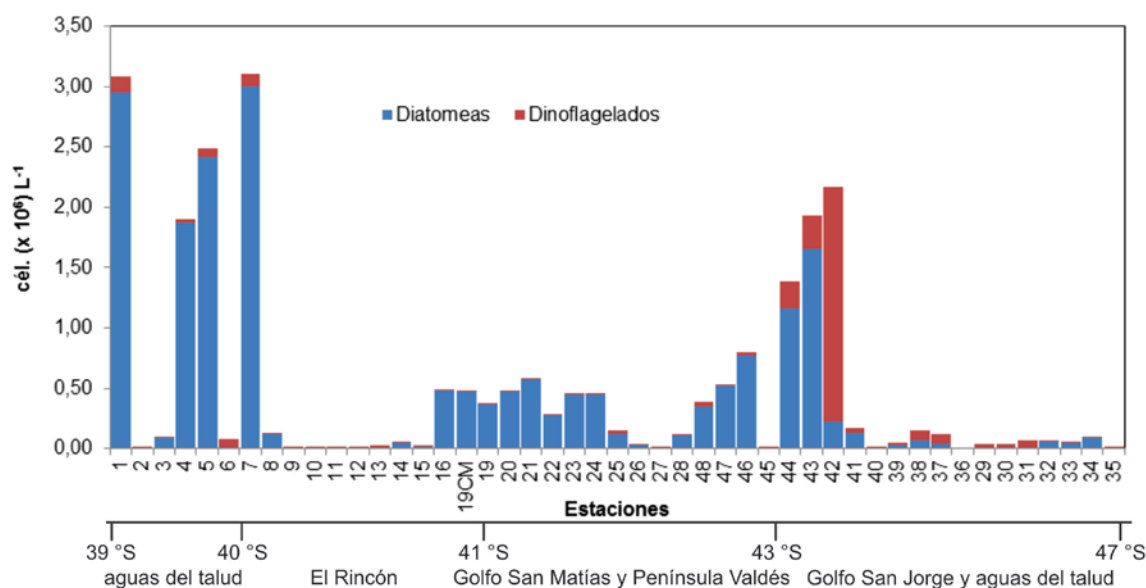


Fig. 3.9: Abundancia de dinoflagelados y diatomeas observada en muestras de botella durante la C3.

3.2.4 Campaña de verano (C4)

Temperatura y Salinidad

La temperatura mostró un marcado gradiente latitudinal, con valores máximos de 15 °C hacia el norte del área de estudio y valores mínimos de 5 °C al sur (Fig. 3.10). La salinidad también presentó un gradiente similar con valores máximos en las estaciones del norte y centro de área de estudio. Hacia el sur y en aguas adyacentes al talud, se observó un pico de salinidad de 34.

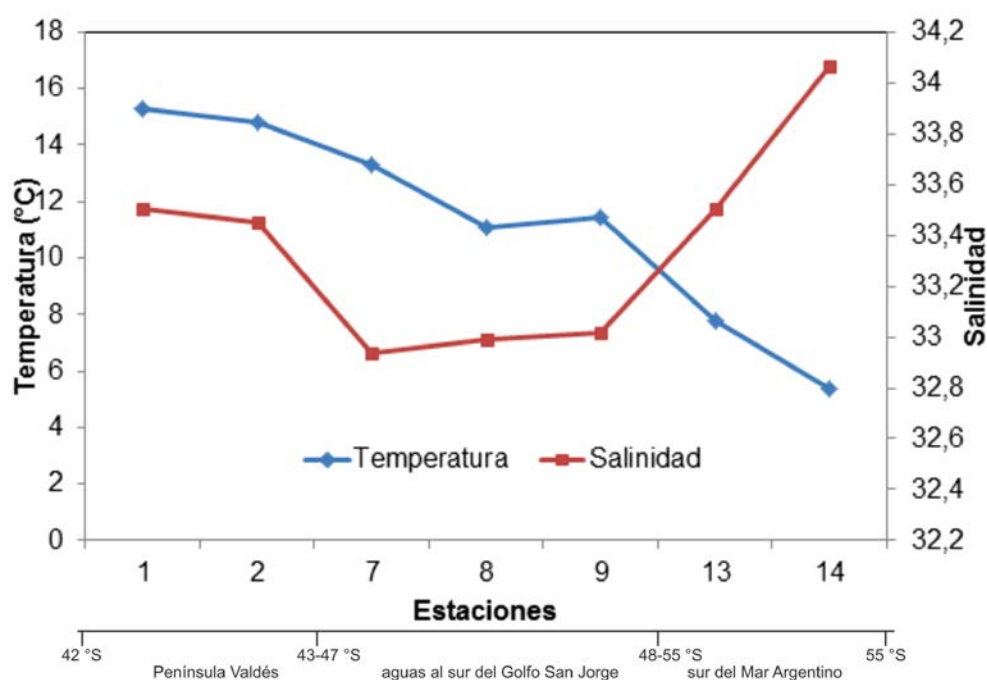


Fig. 3.10: Valores de temperatura y salinidad observados durante la C4.

Abundancia y composición planctónica

La densidad planctónica total varió entre 2×10^5 y 13×10^6 cél. L^{-1} , con un promedio de $3,1 \times 10^6$ cél. L^{-1} . El pico máximo se observó en aguas adyacentes a Península Valdés (Fig. 3.11), con un marcado predominio de fitoflagelados menores a $10 \mu m$. Este grupo dominó también en el resto de las muestras analizadas, excepto en una estación al sur del área de estudio ($55^\circ S$), la cual estuvo dominada por diatomeas (Fig. 3.11), principalmente del género *Pseudo-nitzschia*, el cual alcanzó una densidad de 400.000 cél. L^{-1} . La abundancia máxima de dinoflagelados (373.000 cél. L^{-1}) se encontró en aguas adyacentes a Península Valdés (Fig. 3.12) y estuvo dada por altas densidades de dinoflagelados atecados de pequeño tamaño.

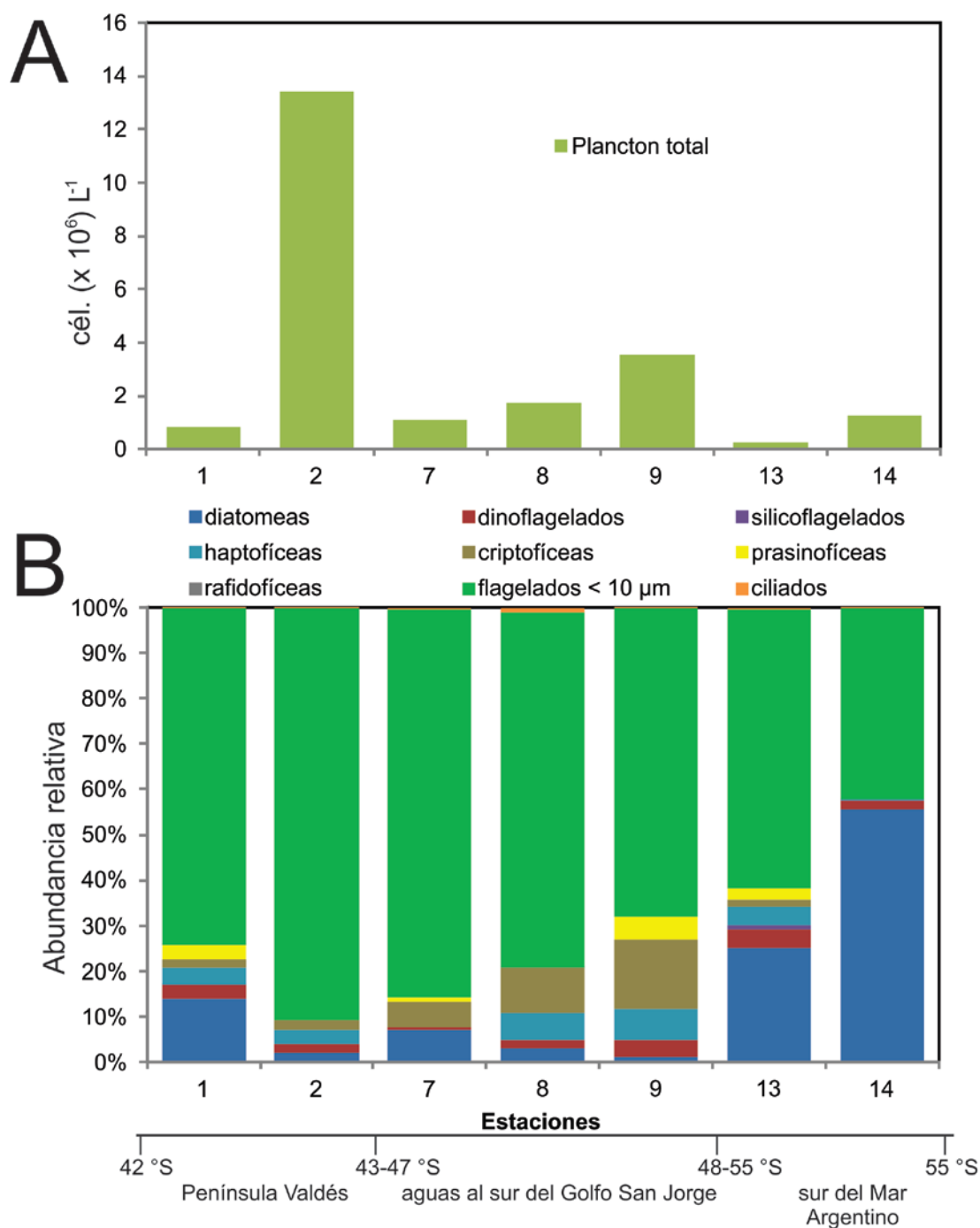


Fig. 3.11: (A) Abundancia del nano y microplancton total (cél. L⁻¹) y (B) abundancia relativa (%) de los diferentes grupos del nano y microplancton observadas en las muestras de botella durante la C4.

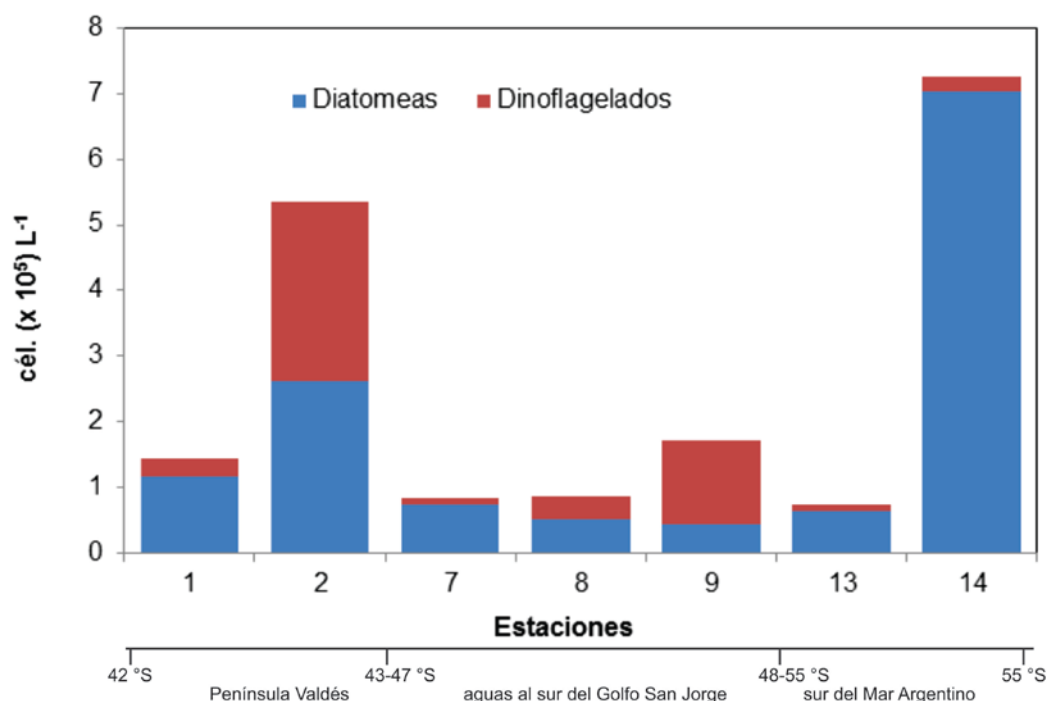


Fig. 3.12: Abundancia de dinoflagelados y diatomeas observada en muestras de botella durante la C4.

3.3 Discusión y Conclusiones

Tanto la densidad total de células como la de los principales grupos fitoplanctónicos mostraron una gran variabilidad durante las cuatro campañas analizadas (Tabla 3.1). Sin embargo, las máximas abundancias planctónicas totales se observaron durante la primavera, lo cual se condice con el mayor desarrollo del fitoplancton durante las floraciones primaverales, típicas de regiones con una estacionalidad bien marcada (Siegel et al., 2002; Sommer & Lengfellner, 2008). Por el contrario, los valores promedio más bajos de abundancia se observaron durante las campañas de verano y verano tardío (C2 y C4). En este sentido, es conocido que durante el verano se observa una baja abrupta en la densidad fitoplanctónica en la región norte del Mar Argentino. (Rivas et al., 2006). Por otro lado, se han registrado picos de clorofila desde octubre a febrero mediante mediciones satelitales en la región patagónica (Marrari et al., 2017) y en el frente del talud, persistiendo durante todo el verano, indicando un suministro efectivo de nutrientes a la capa superior durante la temporada cálida (Romero et al., 2006). Durante la campaña de otoño se observaron abundancias promedio intermedias, aunque esto estuvo influenciado por los picos ($\approx 20 \times 10^6$ cél. L⁻¹) detectados en la zona estuarina de Bahía Grande ($\approx 50^\circ$ S), donde la

columna de agua se encuentra mezclada verticalmente a lo largo del año resultando en una alta disponibilidad de nutrientes en las capas superiores, lo cual promueve el desarrollo del fitoplancton (Sabatini et al., 2004). En este sentido, se pudo observar que a lo largo de las cuatro campañas las zonas con mayor abundancia fitoplanctónica se relacionaron, en su mayoría, con la presencia de frentes o sitios de confluencia de diferentes masas de agua (Acha et al., 2004). En estas zonas, representadas por la región externa del estuario de Bahía Blanca, Península Valdés, el Golfo San Jorge, la zona de Bahía Grande y el talud continental, también se hallaron las máximas abundancias tanto de dinoflagelados como de diatomeas.

	Abundancias planctónicas totales (cél. L ⁻¹)	Promedio (cél. L ⁻¹)	Abundancia máxima de dinoflagelados (cél. L ⁻¹)	Promedio (cél. L ⁻¹)	Abundancia máxima de diatomeas (cél. L ⁻¹)	Promedio (cél. L ⁻¹)
C1 otoño	0,1 x10 ⁶ -23 x10 ⁶	2 x10 ⁶	218.500	16.000	26.800	3.000
C2 verano tardío	0,1 x10 ⁶ -5 x10 ⁶	0,5 x10 ⁶	126.000	40.500	536.500	39.000
C3 primavera	0,1 x10 ⁶ -27 x10 ⁶	3,4 x10 ⁶	2 x10 ⁶	77.000	3 x10 ⁶	415.000
C4 Verano temprano	0,2 x10 ⁶ -13 x10 ⁶	3,1 x10 ⁶	273.000	71.800	700.000	188.000

Tabla 3.1: Abundancias absolutas y promedios de fitoplancton total, dinoflagelados y diatomeas durante las cuatro campañas.

En términos de la composición general del fitoplancton, y considerando el total de estaciones realizadas en las cuatro campañas, se observó el predominio de fitoflagelados de pequeño tamaño (<10 µm) en el 80 % de las estaciones de muestreo, lo cual coincide con trabajos previos realizados en distintas épocas del año en el Mar Argentino (Carreto et al. 2003; Almandoz et al. 2007; Silva et al., 2009; Garibotti et al., 2011; Negri et al., 2013) (Fig. 3.12). Sin embargo, en algunas ocasiones predominaron otros grupos con representantes de mayor tamaño, tales como dinoflagelados, diatomeas, haptofíceas y criptofíceas.

Los dinoflagelados alcanzaron densidades celulares altas (~2 x10⁶ cél. L⁻¹) al sur de la Provincia de Buenos Aires, frente a Península Valdés y en aguas del talud, tanto

en otoño como en primavera, representadas por floraciones de *Prorocentrum cordatum* (Fig. 3.13). En este sentido, esta especie suele formar floraciones en zonas frontales como Península Valdés, el Golfo San Jorge y la zona de Bahía Grande, así como en la región costera norte de la Provincia de Buenos Aires, especialmente en aguas cercanas al estuario del Río de La Plata (Carreto et al., 2003, 2007, 2008; Gómez et al. 2011b, Sabatini et al. 2012; Segura et al., 2013; Martínez & Ortega, 2016). Así también, los dinoflagelados se hallaron como grupo dominante en aguas del talud y en los golfos San Matías y San Jorge, presentando también en este último altas densidades celulares ($\sim 200.000 \text{ cél. L}^{-1}$) durante el otoño, dadas por los géneros *Azadinium*, *Prorocentrum*, *Tripos* y *Protoperidinium*, además de dinoflagelados atecados de pequeño tamaño no identificados (Fig. 3.13). El predominio de dinoflagelados ha sido mencionado en estudios previos, especialmente para la zona estratificada del Golfo San Jorge y durante la primavera (Akselman 1996; Carreto et al., 2007; Krock, et al., 2015).

Las diatomeas se observaron en altas abundancias ($\sim 3 \times 10^6 \text{ cél. L}^{-1}$) y como grupo dominante en aguas del talud y principalmente durante la primavera. Esto puede asociarse con la presencia del frente del talud, a lo largo del cual suelen encontrarse intensas proliferaciones de diatomeas (García et al., 2008; Carreto et al., 2016), vinculadas al incremento de la estabilidad vertical y la provisión de nutrientes a la zona eufótica por las aguas de la Corriente de Malvinas (Carreto et al., 1986, 1995, 2007).

Las criptofíceas (Fig. 3.14) se observaron en forma frecuente durante la campaña de verano, durante la cual alcanzaron abundancias moderadas ($137.000 \text{ cél. L}^{-1}$) y representaron el grupo dominante del fitoplancton en aguas costeras adyacentes a Península Valdés. Es conocido que las criptofíceas suelen ser uno de los grupos mejor representados del fitoplancton, principalmente en aguas estuarinas como el estuario de Bahía Blanca durante el verano (Guinder et al., 2012) y en el frente marítimo del Río de La Plata (Carreto et al., 2003).

Finalmente, se observaron elevadas abundancias y predominio de haptofíceas del género *Phaeocystis* (Fig. 3.14), formando sus típicas colonias globosas, en algunas estaciones de muestreo ubicadas al sur del Golfo San Matías durante la primavera (C3). En este sentido, abundancias elevadas del género *Phaeocystis* se han observado previamente durante la primavera, asociadas a frentes en la plataforma y el talud (Carreto et al., 1995, 2003) y a la zona de transición de los frentes de marea patagónicos (Carreto et al., 2007).

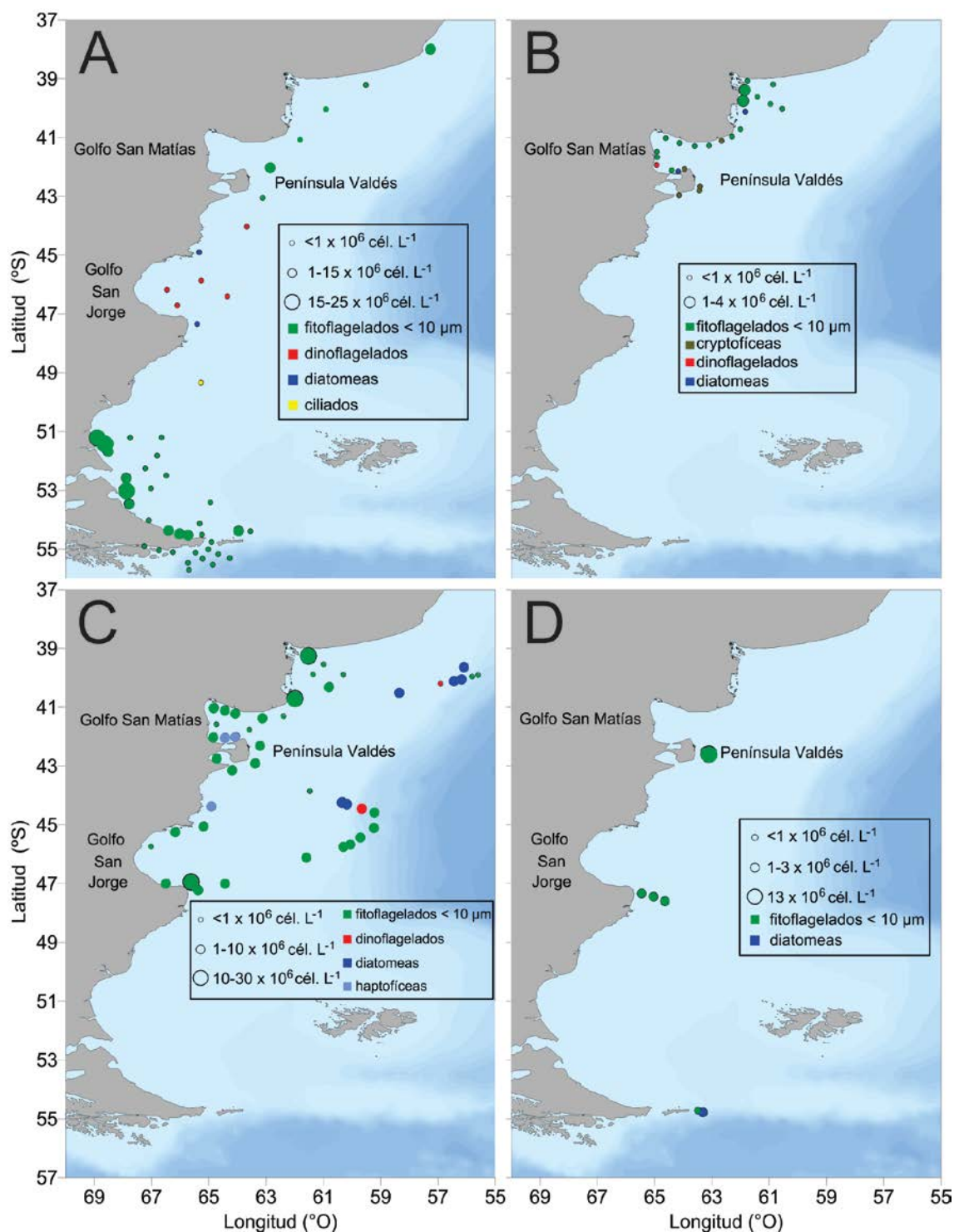


Fig. 3.12: Mapas del área de estudio indicando las abundancias fitoplanctónicas totales en cada estación de muestreo durante las cuatro campañas (tamaño de los círculos). Los colores indican cual fue el grupo dominante. A) C1. B) C2. C) C3. D) C4.

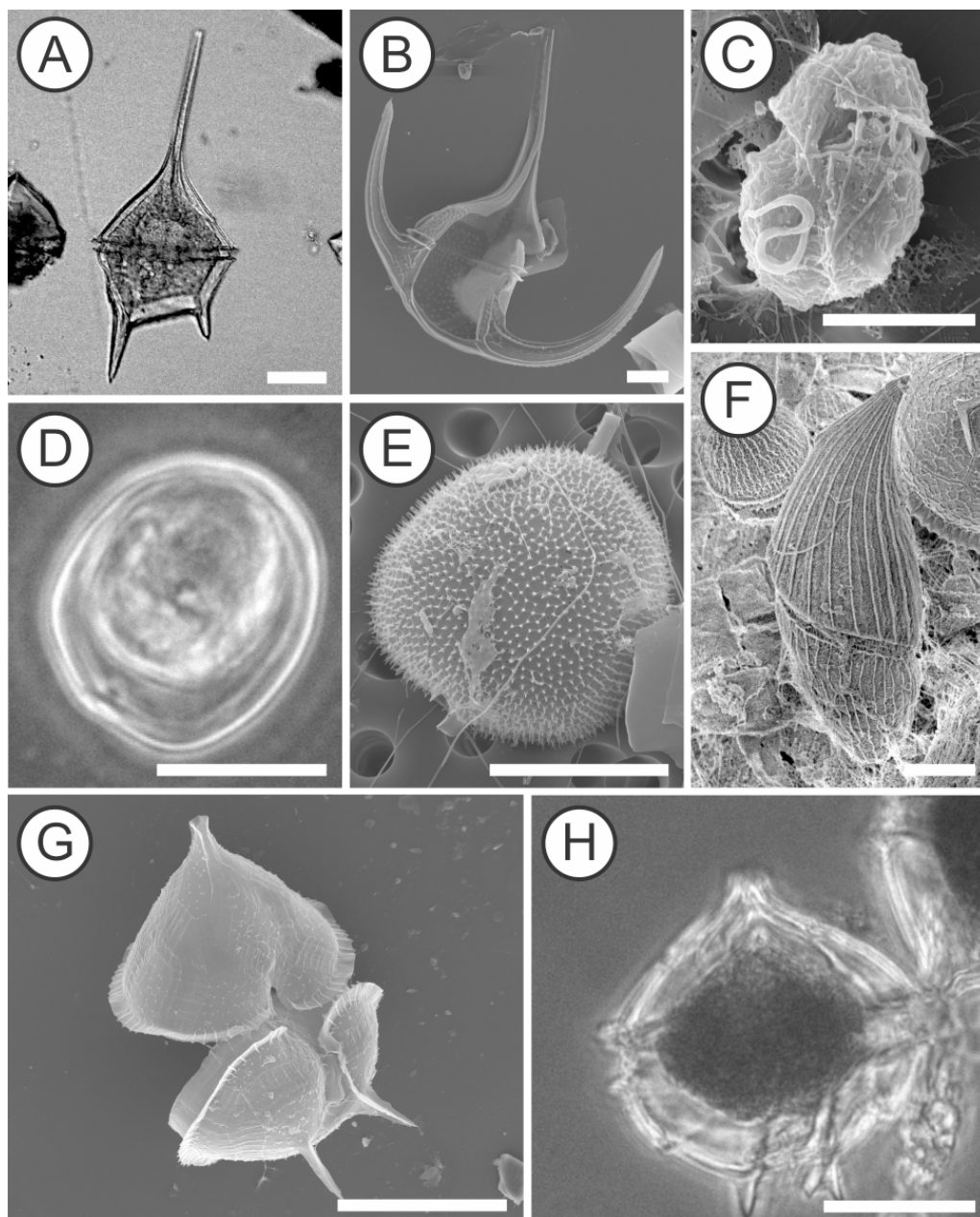


Fig. 3.13: Fotografías tomadas con microscopía óptica (A, D, H) y electrónica de barrido (B, C, E-G) de los dinoflagelados encontrados en mayores abundancias durante las cuatro campañas. A-B) Dinoflagelados tecados pertenecientes al género *Tripos*. A) *T. pentagonum*. B) *T. muelleri*. Escala: 10 μm . C) Dinoflagelado atecado no identificado menor a 10 μm . Escala: 5 μm . D, E) Dinoflagelado tecado: *Prorocentrum cordatum*. Escala: 10 μm . F) Dinoflagelado atecado aff. *Gyrodinium fusus*. Escala: 10 μm . G, H) Dinoflagelados tecados del género *Protoperidinium*. Escala: 20 μm .

En particular, las abundancias máximas de dinoflagelados detectadas durante las cuatro campañas variaron entre $1,2 \times 10^5$ y 2×10^6 cél. L^{-1} , correspondiendo el valor máximo a la campaña de primavera y el mínimo a la de verano tardío. Tanto en la campaña de primavera como en la de otoño las mayores abundancias estuvieron dadas por floraciones de la especie *Prorocentrum cordatum*, una especie que es considerada

por algunos autores como potencialmente tóxigena (Okaichi and Imatomi, 1979; Nakajima, 1965 a, b, c, 1968; Akselman, 1999; Denardou-Queneherve et al., 1999). Sin embargo, los reportes de intoxicaciones en humanos relacionados con floraciones de esta especie son raros y no concluyentes, debido a que otras especies tóxicas (Ej: *D. acuminata*), estuvieron presente en bajas densidades celulares durante los eventos de intoxicación (Tangen, 1983; Langeland et al., 1984; Kat, 1979, 1985; Freudenthal & Jijina, 1985; Taylor et al., 2003). Sumado a esto, la producción de toxinas en *P. minutum* no ha sido corroborada fehacientemente en condiciones de cultivo (Heil et al., 2005). Si bien en una oportunidad se detectó toxicidad a partir de ensayos en ratón realizados con extractos de cultivos de esta especie aislados del Mediterráneo francés, la presencia de toxinas en dichos extractos no pudo ser detectada, por lo cual se cree que la toxicidad en ratones podría estar asociada a la presencia de un grupo particular de bacterias (Grzebyk et al., 1997). A pesar de la falta de evidencia necesaria para considerar a *P. cordatum* una especie tóxigena, cabe mencionar que sus floraciones pueden provocar efectos de anoxia en los cuerpos de agua y generar efectos nocivos en invertebrados y peces marinos (Heil et al., 2005).

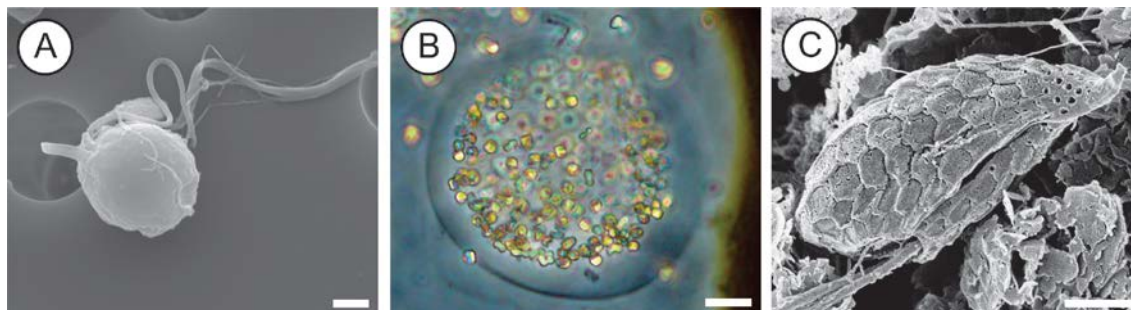


Fig. 3.14: Fotografías tomadas con microscopía óptica (B) y electrónica de barrido (A, C) de los grupos del nano y microplankton encontrados en mayores abundancias durante las cuatro campañas. A) flagelados < 10 μm . Escala: 1 μm . B) *Phaeocystis* aff. *globosa*. Escala: 5 μm . C) Criptoficea. Escala: 2 μm .

Finalmente, las abundancias máximas de diatomeas durante las cuatro campañas de muestreo variaron entre $2,68 \times 10^4$ y 3×10^6 cél. L^{-1} , correspondiendo el valor máximo a la campaña de primavera y el mínimo a la de otoño. Las mayores densidades celulares se detectaron al sur del área de muestreo (55°S), en aguas adyacentes al talud, y en la boca sur del Golfo San Jorge. Dentro de los géneros que alcanzaron las máximas abundancias se encontró a *Pseudo-nitzschia*, el cual posee especies que producen ácido domoico (AD), una neurotoxina causante del Envenenamiento Amnésico de Moluscos

(EAM), con síntomas como desórdenes gastrointestinales y neurológicos, del equilibrio, desorientación, de la memoria de corto plazo e incluso la muerte (Todd, 1993). En el Mar Argentino, la presencia de especies toxígenas de *Pseudo-nitzschia* y su asociación con AD en muestras de campo está bien documentada (Ej.: Negri et al., 2004; Krock et al., 2015; Almandoz et al., 2007, 2017), incluso se ha postulado que floraciones de *Pseudo-nitzschia* podrían ser las causantes de mortandad de ballenatos de ballena franca austral a lo largo de Península Valdés (D'Agostino et al., 2015; Wilson et al., 2015).

Capítulo 4: Especies de Dinophysis y toxinas asociadas



4.1 Introducción

Filogenéticamente el género *Dinophysis* Ehrenberg pertenece al orden *Dinophysiales*, del cual es su género tipo. Desde el punto de vista morfológico se caracteriza por presentar una teca comprimida lateralmente y dividida en tres regiones: una epiteca corta, una hipoteca bien desarrollada y un área cingular delimitada por dos aletas, la cingular anterior (ACA) y la cingular posterior (ACP). El sulcus ocupa gran parte de la región ventral y se caracteriza por poseer una aleta izquierda (ASI) prominente y una aleta derecha (ASD) corta o de moderado tamaño dependiendo de la especie, pero nunca mayor a la ASI (Fig. 4.1). Los caracteres más utilizados en la diferenciación de especies dentro del género son la forma y tamaño celular, la ornamentación de la hipoteca, las características de las aletas, principalmente de la ASI y sus radios (R1, R2 y R3), y la presencia o ausencia de cloroplastos (Balech, 1988).

El género *Dinophysis* incluye más de 120 especies tanto fotosintéticas como exclusivamente heterótrofas distribuidas en los océanos de todo el mundo (Jensen & Daugbjerg, 2009). Algunas de estas especies son consideradas cosmopolitas, como *D. acuminata*, que tolera un amplio rango de temperaturas (Kamiyama, 2010), mientras que otras especies tales como *D. norvegica* y *D. tripos* poseen requerimientos ambientales más estrictos y se distribuyen únicamente en aguas boreales y templado-tropicales, respectivamente (Reguera et al., 2012).

Del total de las especies descritas del género *Dinophysis*, 10 son reconocidas como productoras de toxina diarreica de moluscos (TDM) y han sido asociadas con el síndrome diarreico por moluscos en humanos (SDM) (Reguera & Pizarro, 2008). Los síntomas más frecuentes asociados con el SDM son diarrea, náuseas, vómitos y dolor abdominal (Yasumoto et al., 1980). A su vez, la reiterada exposición a TDM puede provocar trastornos crónicos del sistema digestivo. El primer reporte clínico de síntomas diarreicos relacionados al consumo de moluscos proviene de Holanda en el año 1961 (Korringa & Roskam, 1961), pero el organismo causante no fue determinado sino hasta los años ochenta cuando se describió un nuevo síndrome (SDM) (Yasumoto et al., 1978) y *D. fortii* se identificó como el agente tóxico (Yasumoto et al., 1980). Estudios posteriores confirmaron al ácido okadaico (AO) y a las dinophysistoxinas (DTX) como los principales compuestos responsables del mencionado síndrome (Murata et al., 1982).

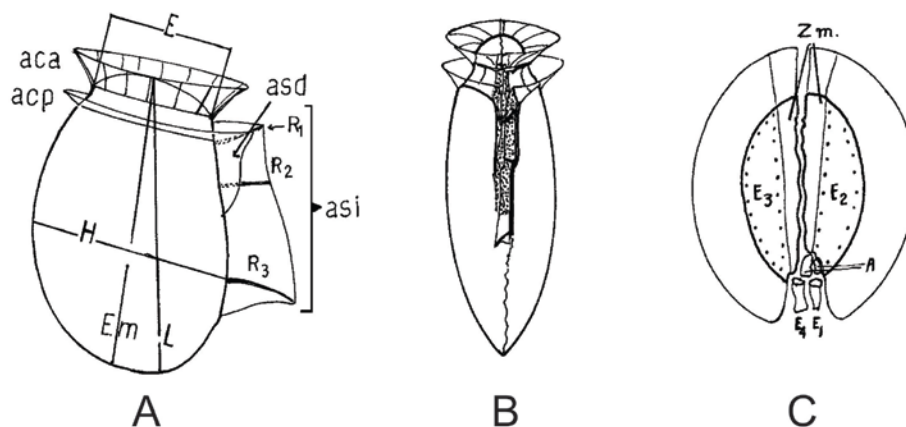


Fig. 4.1: A) vista lateral mostrando parámetros utilizados en la descripción morfológica del género *Dinophysis*, L: largo máximo, Em: largo de la hipoteca, H: profundidad dorsoventral o ancho, E: ancho de la epiteca, asd: aleta sulcal derecha, asi: aleta sulcal izquierda, aca: aleta cingular anterior, acp: aleta cingular posterior, $R_{(1,2,3)}$: radios de la asi. B) vista ventral. C) vista apical. (tomado de figs. 2-3-4 de Balech, 2002).

El establecimiento exitoso de las primeas cepas en cultivo del género *Dinophysis* se realizó recién en el año 2006 (Park et al., 2006), lo cual trajo aparejado un análisis tardío de la toxicología del género, comparado con otros géneros toxígenos. Por otro lado, los representantes tóxicos de *Dinophysis* son un claro ejemplo de que aún bajas densidades de células en el plancton son capaces de generar episodios de intoxicación (Reguera et al., 2014 y referencias incluidas). Esta característica dificultó durante muchos años la identificación de especies de *Dinophysis* como productoras de toxinas debido a que los eventos de intoxicación se atribuían a otras especies de dinoflagelados más abundantes (Kat, 1985).

Dentro de las TDM tanto el AO como sus análogos, las DTX (Fig. 4.2), son de gran importancia en cuanto a su toxicidad en vertebrados por ser fuertes inhibidores de la enzima fosfatasa (Bøe, 1991), la cual regula procesos celulares tales como el ciclo celular, la muerte celular por apoptosis, el desarrollo de tumores y la contracción del músculo liso. Su estructura química se caracteriza por la presencia de cadenas polihidroxiladas y anillos éter (poliéteres). Mientras que el AO y la DTX-2 difieren entre sí por la posición de un grupo metil en la molécula, la DTX-1 posee un grupo metil adicional y el grupo de las DTX-3 abarca derivados de los mencionados análogos esterificados con ácidos grasos saturados e insaturados resultado de la transformación enzimática en moluscos (Suzuki et al., 2001a,b).

El género *Dinophysis* es también productor de pectenotoxinas (PTX), una gran familia de toxinas lipofílicas que a pesar de no provocar síntomas diarreicos está asociada con el complejo de TDM, ya que la extracción química de estos dos grupos de sustancias lipofílicas se realiza simultáneamente en los análisis toxicológicos (Yasumoto et al., 1985). En cuanto a su estructura química las PTX son lactonas cíclicas (Fig. 4.3) que difieren estructuralmente entre sí por diferentes grados de oxidación, diferentes arreglos del sistema espiral de anillos y por la hidrólisis de la lactona (Quilliam, 2003). Las PTX conocidas hasta el momento pueden ser tanto producidas por especies de *Dinophysis* (entre ellas PTX-2 y PTX-11) o ser el resultado de la acción de enzimas digestivas de moluscos sobre PTX sintetizadas por células de *Dinophysis* (por ejemplo PTX-2sa, PTX-1, PTX-3 y PTX-6) (Lee et al., 1989; Suzuki et al., 1998; Ciminiello et al., 2010). Estudios toxicológicos indican que las PTX no producen efectos diarreicos al ser administradas oralmente a roedores de laboratorio, pero la PTX-1 es altamente hepatotóxica (Terao et al., 1986), generando inducción de apoptosis en hepatocitos de salmón y rata (Domínguez et al., 2010). También se ha atribuido a algunas PTX citotoxicidad frente a distintas líneas de cáncer humano (Domínguez et al., 2010). El riesgo para la salud humana respecto de este grupo de toxinas se encuentra actualmente en discusión.

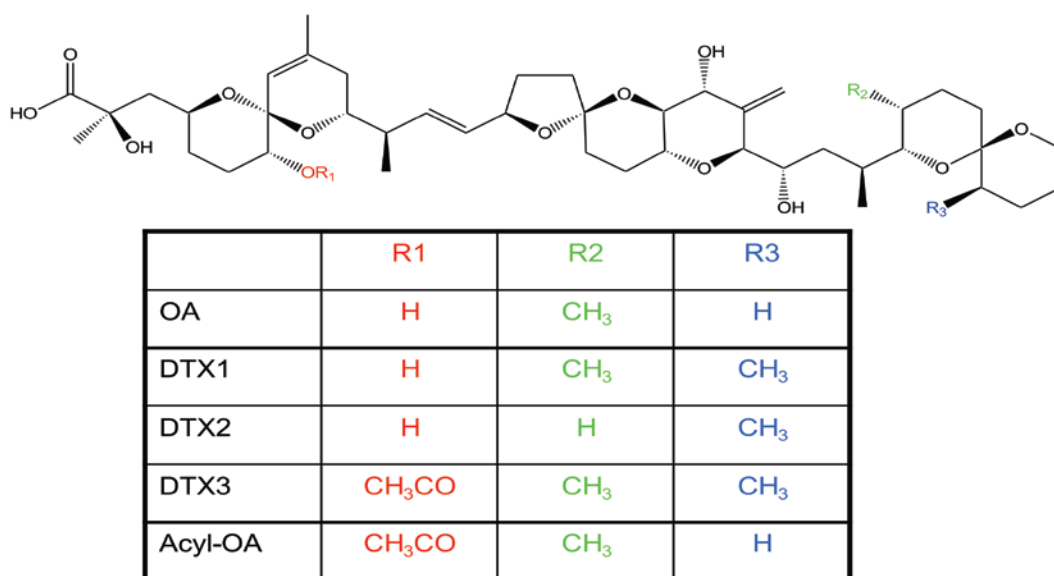


Fig. 4.2: Estructura química del ácido okadáico (AO) y la variabilidad de análogos de dinophysistoxinas (DTX) según los grupos químicos de los radicales R1, R2 y R3.

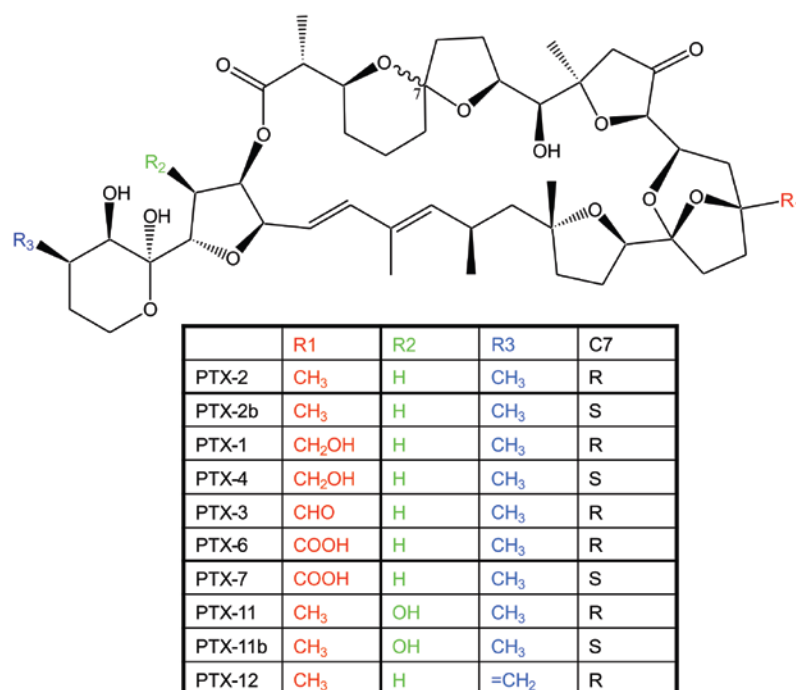


Fig. 4.3: Estructura química de la pectenotoxina (PTX) y la variabilidad de análogos según los grupos químicos de los radicales R1, R2 y R3.

En el “Mar Argentino” de las aproximadamente 30 especies del género *Dinophysis* citadas por Balech (1988), cuatro de ellas (*D. acuminata*, *D. tripos*, *D. caudata* y *D. fortii*) se encuentran actualmente consideradas como productoras de TDM y se incluyen en la lista de algas tóxicas de la UNESCO (Zingone & Larsen, 2014). Por otro lado, *Phalacroma rotundatum* también forma parte de esta lista (= *D. rotundata*), aunque su capacidad toxicológica se encuentra en duda hasta el momento. En este sentido, se han encontrado evidencias de que *P. rotundatum* actúa como vector de toxinas producidas en especies de *Dinophysis* con las cuales co-ocurre, previamente fagocitadas por el ciliado del cual se alimenta *P. rotundatum* (*Tiarina* cf. *fusus*) (Pizarro 2008; González-Gil et al., 2011). En este sentido, la capacidad de producción de toxinas *de novo* en organismos heterótrofos está altamente cuestionada ya que existen evidencias de una relación tanto entre las rutas metabólicas como entre genes relacionados con la producción de toxinas y la presencia de plástidos (Granéli & Turner, 2006; Kim et al., 2008).

En la Argentina, el primer caso documentado de SDM en humanos fue en el año 2001 en la provincia de Chubut, debido al consumo de bivalvos provenientes de los Golfos San José y Nuevo ($\approx 42^\circ \text{S}$), cuya toxicidad se atribuyó al dinoflagelado bentónico *Prorocentrum lima* (Gayoso et al., 2002). Recientemente un nuevo episodio

de SDM, a raíz del cual tres personas intoxicadas debieron ser hospitalizadas, ocurrió en la costa norte de la provincia de Buenos Aires durante el verano de 2010 y estuvo asociado a la presencia de *D. acuminata* y *D. caudata*. Durante este episodio se detectaron AO, DTX-1 y sus acyl-derivados en moluscos de la zona utilizando detección por fluorescencia y HPLC (Sar et al., 2010, 2012). Durante el año 2012 bioensayos en ratón arrojaron resultados positivos para TDM en moluscos colectados en la misma región y se encontraron relacionados con la presencia de *D. acuminata* desde enero a julio y de *D. caudata* desde noviembre hasta marzo de 2013 (Sunesen et al., 2014). Resultados de programas de monitoreo llevados a cabo entre los años 2009 y 2011 en los Golfos norpatagónicos (San Matías, San José y Nuevo) también arrojaron resultados positivos en bioensayos para TDM en moluscos de la zona, relacionados en este caso con la presencia de *D. tripos* (Gracia Villalobos et al., 2015). Adicionalmente, PTX-2 ha sido detectada en áreas costeras en la Provincia de Buenos Aires (Montoya et al., 2013), en el Golfo San Jorge (Krock et al., 2015), y en los Golfos de San José y Nuevo (Gracia Villalobos et al., 2015).

En el presente capítulo se presentan los resultados del análisis morfológico, de distribución y abundancia de las especies del género *Dinophysis* y su relación con la detección de toxinas encontradas durante las cuatro campañas de muestreo a lo largo del Mar Argentino.

4.2 Descripción morfológica de las especies encontradas

Dinophysis acuminata Claparède & Lachmann (Fig. 4.4)

Balech (1988): 39, Lam. 5, Figs. 5-10; Reguera (2003): 57, Fig. 2.4.

Sinónimos: *Dinophysis ellipsoides* Kofoid; *Dinophysis lachmannii* Paulsen; *Dinophysis skagii* Paulsen; *Dinophysis borealis* Paulsen; *Dinophysis boehmii* Paulsen.

Forma elíptica en vista lateral (Fig. 4.4 A-C). Ancho máximo en la región media de la célula. Epiteca pequeña, convexa o aplastada, no visible en vista lateral. Hipoteca marcadamente convexa en el borde dorsal y levemente convexa en el borde ventral. ASI corta, llegando hasta la mitad de la célula aproximadamente, doblada hacia la derecha en la región media, R2 más cercana a R1 que a R3 (Fig. 4.4 A, G, D-F). ASD levemente doblada hacia la izquierda a la altura de R1 (Fig. 4.4 D-E). Extremo posterior de la

hipoteca redondeado presentando protuberancias en algunos pocos ejemplares (Fig. 4.4 G-H). Areolas circulares, todas con un poro central, generalmente profundas que suelen hacerse menos evidentes hacia el borde de la célula (Fig. 4.4 A, D-F). Muy pocos ejemplares con areolación muy tenue pero presentando siempre el poro central (Fig. 4.4 B). Presencia de plástidos obtenidos de presas (el ciliado *Mesodinium rubrum*) evidenciables por la coloración anaranjada en algunos ejemplares (Park et al., 2006) (Fig. 4.4 I).

Dimensiones: L 36-48 μm ; H 29-42 μm ($n= 30$).

***Dinophysis tripos* Gourret**

(Fig. 4.5)

Balech (1988): 45, Lam. 7, Figs. 7-9; Reguera & González-Gil (2001): Figs. 3-5; Reguera (2003): 66, Fig. 2.8; Rodríguez et al. (2012), Fig. 3 A y C.

Sinónimo: *Dinophysis caudata* var. *tripos* (Gourret) Gail

Epiteca chata, no visible en vista lateral. Forma asimétrica característica por la presencia de dos proyecciones antapicales, una mayor en la región ventral y una de ubicación dorsal, siempre de menor tamaño (Fig. 4.5 A-E). Margen ventral recto hasta el final de la ASI donde forma una concavidad de la que se origina la proyección ventral, la cual posee ambos márgenes rectos. Margen dorsal cóncavo hasta la altura de R2, donde comienza la proyección dorsal y se vuelve recto o convexo. ACA muy desarrollada con forma de embudo y con múltiples radios (Fig. 4.5 A-E). ASI amplia y triangular, presenta una ornamentación reticular en la mayoría de los ejemplares (Fig. 4.5 A-C, E). R3 muy desarrollado y R2 equidistante entre R1 y R3. ASD angosta y larga, haciéndose más fina hacia R3 donde finaliza (Fig. 4.5 A-B). Areolas profundas y circulares, cada una con un poro (Fig. 4.4 A-C). Posee plástidos. Similar a *D. caudata*, se diferencian por la presencia de la proyección dorsal en *D. tripos* (ausente en *D. caudata*) y por el contorno dorsal de *D. tripos*, cóncavo y luego recto, mientras que en *D. caudata* es convexo y forma una “panza” dorsal.

Dimensiones: L 79–100 μm ; E 42–50 μm ($n= 30$).

Además de las células grandes típicas se encontraron células intermedias (Fig. 4.5 H) y pequeñas (Fig. 4.5 F-G), las cuales corresponden a gametos de la especie (Reguera 2003; Rodríguez et al., 2012). Las mismas difieren de las células típicas por sus menores dimensiones (L y H de la hipoteca), por presentar una proyección dorsal reducida en las células intermediarias y ausente en las pequeñas, por la areolación (ausente en células pequeñas) y por la reducción del ancho de la ASI.

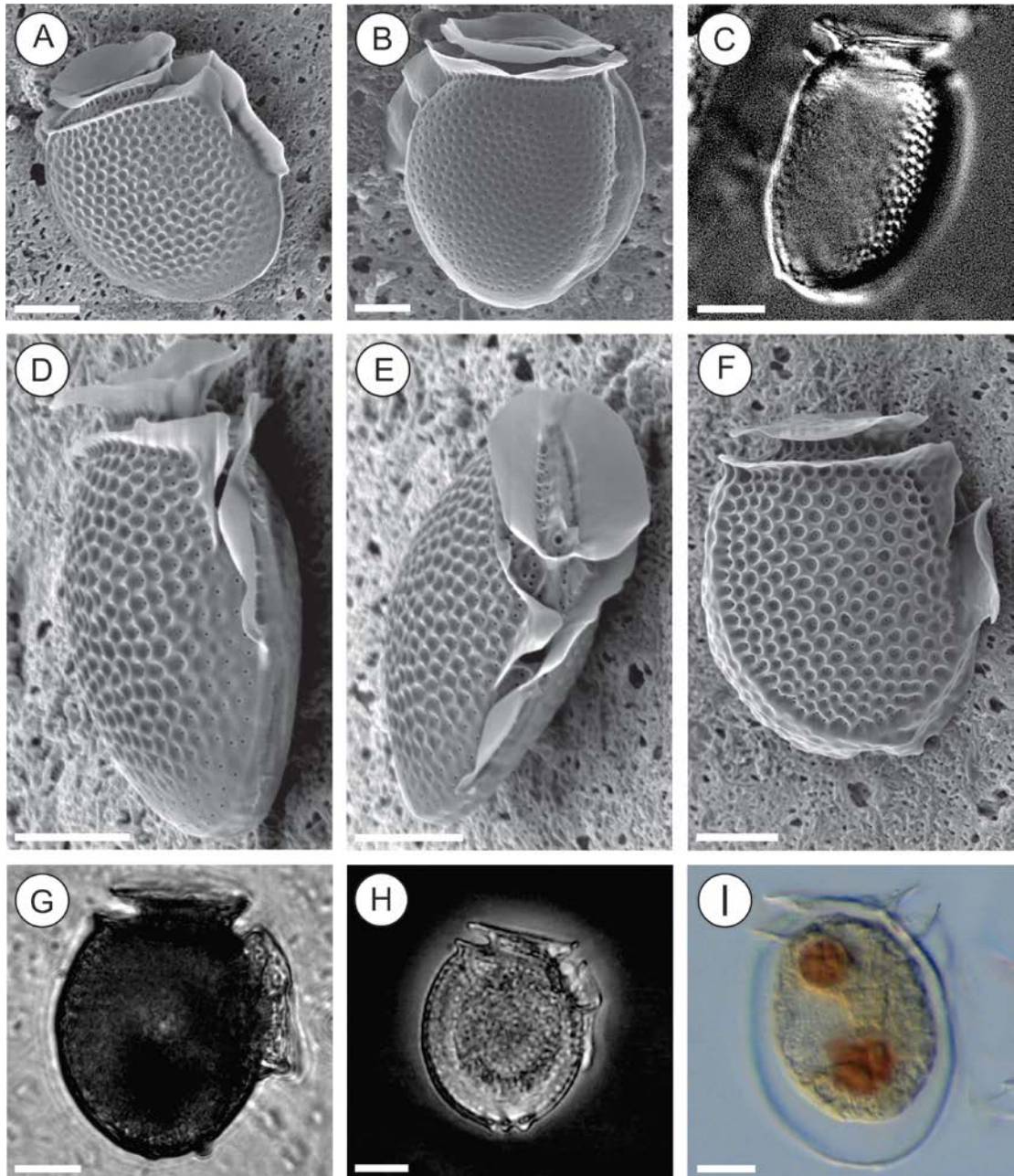


Fig. 4.4: Fotografías de *D. acuminata* tomadas con microscopía electrónica de barrido (A, B, D-F) y óptica (C, G-I). A-C) Aspecto general en vista lateral. D-F) Detalle de aletas sulcales en vista ventral (D, E) y lateral (F). G, H) Vista lateral de ejemplares con protuberancias antapicales. I) Vista lateral de ejemplar con plástidos remanentes de la ingesta del ciliado *Messodinium rubrum*. Barra de escala: 10 μm.

Estas morfologías son aún más fácilmente confundibles con células vegetativas e incluso gametas de *D. caudata* (Reguera & González-Gil, 2001). Los rasgos a tener en cuenta para su diferenciación son: el tamaño de la ACA, muy desarrollada en *D. tripos* y pequeña en *D. caudata*; el largo de la ASI, la cual se continúa hasta la proyección ventral en *D. tripos*; la presencia de un remanente de la proyección dorsal en células

intermedias de *D. tripos*; y los márgenes dorsal y ventral, paralelos en células chicas de *D. tripos* pero convergentes hacia el ápice en *D. caudata*.

También se observaron células recientemente divididas, diferenciables por la falta del segmento anterior o posterior de la ASI, así como células dimórficas, resultantes de la división celular que origina las gametas (Fig. 4.5 I). En ellas se observaron diferentes morfologías de las placas de la hipoteca en la misma célula.

Dimensiones de las células intermedias: L 72–87 μm ; H 28–40 μm ($n=15$).

Dimensiones de las células chicas: L 59–70 μm ; H 25–32 μm ($n=15$).

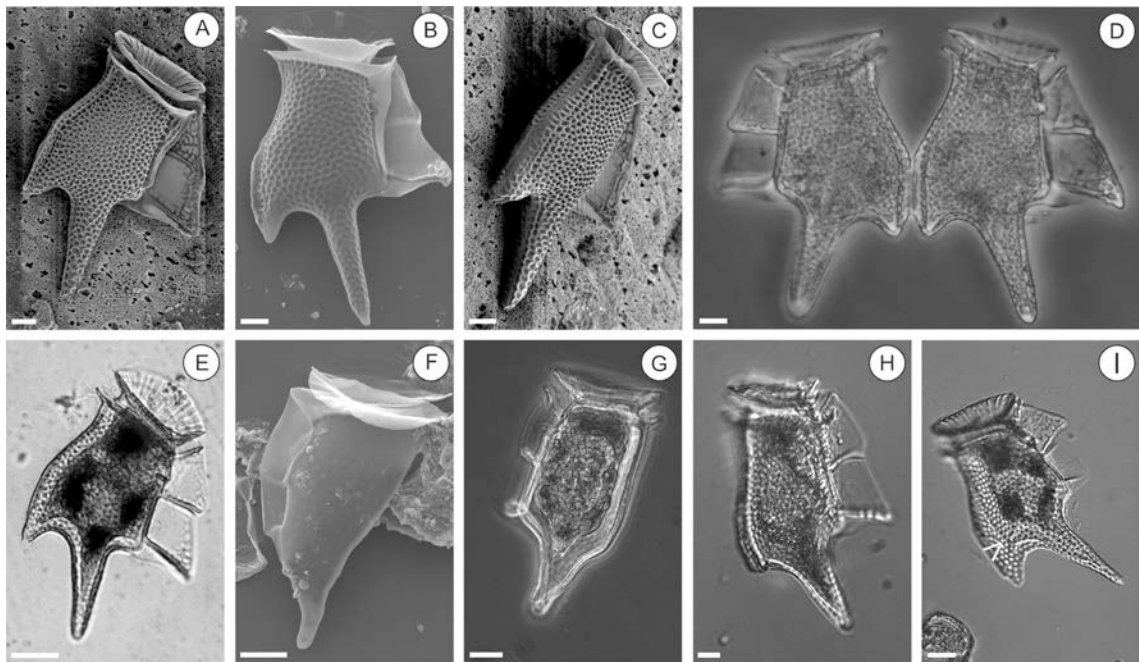


Fig. 4.5: Fotografías de *D. tripos* tomadas con microscopía electrónica de barrido (A-C, F) y óptica (D, E, G-I). A-E) Aspecto general en vista lateral (A, B, D, E) y dorsal (C). D) Dos células unidas luego de la división celular mitótica. F, G) Células pequeñas. H) Célula intermedia. I) Célula dimórfica. Barra de escala: 10 μm .

***Dinophysis caudata* Saville-Kent**

(Fig. 4.6)

Balech (1988): 45, Lam. 8, 2-3; Rodriguez et al. (2012), Fig. 3 B y D.

Sinónimos: *Dinophysis homuncula* Stein; *Dinophysis diegensis* Kofoid.

Células caracterizadas por la presencia de una proyección ventral bien desarrollada y la región dorsal de la hipoteca convexa formando una “panza” dorso-posterior. Márgenes de la proyección ventral algo convexos (en la mayoría de los ejemplares) (Fig. 4.6 A, B), o rectos (Fig. 4.6 C). Epiteca chata, no visible en vista lateral. ACA bien desarrollada con numerosos radios. ASI amplia, ensanchándose levemente hacia R3. R2 equidistante de R1 y R3. Areolas profundas y circulares, cada

una con un poro (Fig. 4.6 A). Se diferencia de *D. tripos* principalmente por la ausencia de proyección dorsal.

Dimensiones: L 75-85 μm ; H 36-46 μm ($n=4$).

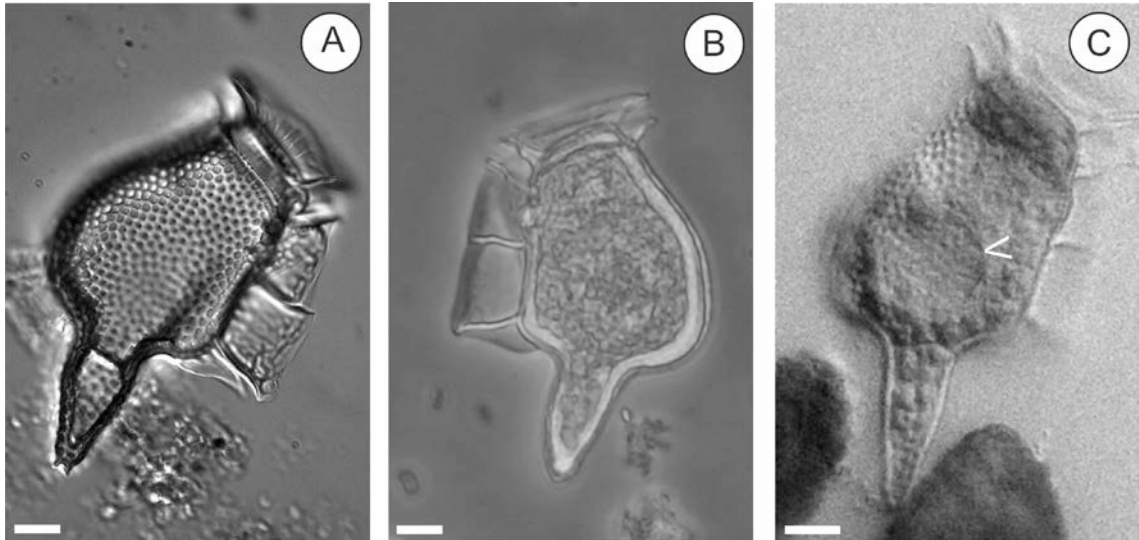


Fig. 4.6: Fotografías de *D. caudata* tomadas con microscopía óptica. A-C) Aspecto general en vista lateral. Barra de escala: 10 μm .

Dinophysis norvegica Claparède & Lachmann

Fig. 4.7

Kraberg (2010): 127.

Sinónimos: *Dinophysis norvegica* var. *debiliior* Paulsen; *Dinophysis debiliior* Paulsen.

Epiteca chata, no visible en vista lateral. Hipoteca convexa dorsalmente, presentando la región más ancha sobre la línea media de la célula (Fig. 4.7 C). La región ventral apical de la hipoteca es recta o convexa, mientras que la mitad posterior presenta una leve concavidad. ASI corta, se extiende apenas más allá de la región media de la hipoteca, doblada hacia la derecha en la región central (Fig. 4.7 A-B). R2 más cercana a R1, R3 de dirección antapical. Las placas mayores de la hipoteca presentan una areolación muy marcada con un poro en cada areola (Fig. 4.7 A-B). Algunas células con protuberancias en el extremo antapical y en el margen dorsal (Fig. 4.7 C). Puede ser confundida con *D. acuta*, pero esta última es generalmente de mayor tamaño (54–100 μm) y posee el ancho mayor por debajo de la línea media de la célula (Balech, 2002).

Dimensiones: L 45-64 μm ; H 35-47 μm ($n=10$).

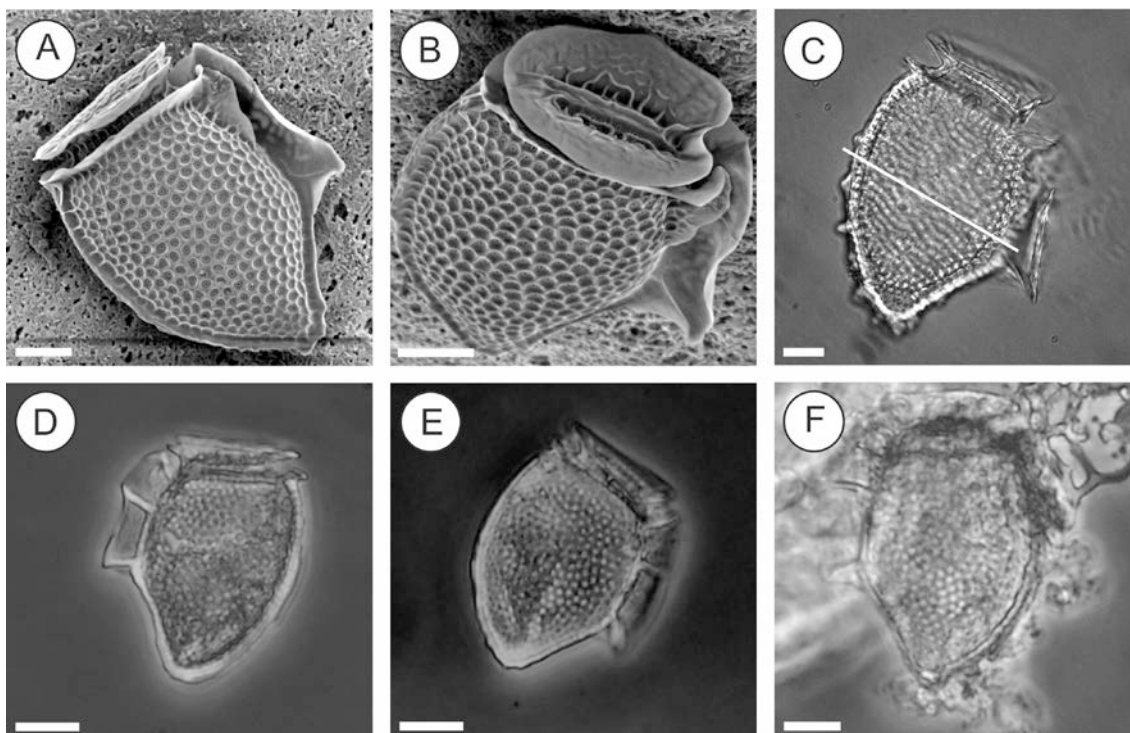


Fig. 4.7: Fotografías de *D. norvegica* tomadas con microscopía electrónica de barrido (A, B) y óptica (C-F). A, C-F) Aspecto general en vista lateral y apical (B), note el mayor ancho de la célula en la mitad anterior (la línea indica la mitad de la célula). C) Ejemplar con protuberancias antapicales y dorsales.

***Dinophysis operculata* (Stein) Balech**

Fig. 4.8 A-B

Balech (1988): 49, Lam. 10, 7-10.

Epiteca alta y cónica, sobresaliendo aproximadamente un tercio del tamaño celular en vista lateral. Hipoteca redondeada. ASI corta y angosta, sobrepasa muy poco el largo de la aleta sulcal derecha, puede estar doblada hacia la derecha. ASD larga alcanzando R3. Aletas cingulares cortas y horizontales, con numerosos radios. Marcada esculturación de la teca con areolas circulares y poro en la mayoría de ellas, presenta una región circular en la hipoteca de areolas más profundas (Fig. 4.8 A).

La epiteca prominente y visible en vista lateral y las aletas cingulares rectas ubicarían a esta especie dentro del género *Phalacroma* (Stein 1883). Sin embargo, ya que no se poseen datos moleculares de esta de *D. operculata*, que las características morfológicas del género *Phalacroma* no se encuentran definitivamente dilucidadas (Hastrup Jensen & Daugbjerg, 2009; Gomez et al., 2011c) y que no se ha realizado un pasaje formal de esta especie al género *Phalacroma*, en este estudio se considera al taxa previamente descrito como perteneciente al género *Dinophysis*.

Dimensiones: L 50-65 μm ; H 49-55 μm ; epiteca 15-17 μm ($n=10$).

Dinophysis truncata Cleve

Fig. 4.8 C-D

Balech (1988): 43, Lam. 7, 1-2.

Forma casi rectangular en vista lateral. Epiteca baja, no visible en vista lateral. Región dorsal de la hipoteca algo convexa y extremo posterior recto o levemente cóncavo en algunos ejemplares. ASI larga alcanzando el límite posterior de la hipoteca. R2 notoriamente más cercana a R1 que a R3. Areolas profundas, cada una con un poro, algunas formando grupos de hasta 4.

Dimensiones: L 55-70; H 34-54 ($n=5$).

Dinophysis aff. subcircularis Paulsen

Fig. 4.8

E

Balech (1988): 41, Lam. 5, 16-18.

Contorno general lentiforme, casi circular, extremo posterior y margen dorsal muy redondeados. Epiteca chica y aplastada, no visible en vista lateral. Margen ventral recto y oblicuo por delante de R2 y convexo entre R2 y R3. ASI corta, afinándose entre R2 y R3. Areolas circulares y profundas atenuándose hacia los márgenes, cada una con un poro.

Dimensiones: L 31-42,5; H 29-35 ($n=15$).

Dinophysis microstrigiliformis Abé

Fig. 4.8 F

Balech (1988): 44, Lam. 8, 12-13.

Forma alargada y angosta, asemejando un saco. Extremo posterior convexo. Epiteca baja, no visible en vista lateral. ASI larga, finaliza en la región posterior de la hipoteca donde comienza la convexidad posterior y se angosta luego de R2. R2 levemente más cerca de R1 que de R3. Especie muy similar a *D. sacculus*, se diferencian principalmente por el largo de la ASI, más corta en *D. sacculus*, terminando hacia la región media de la hipoteca (Balech, 1988). Además *D. sacculus* suele presentar una concavidad en el margen dorsal mientras que en *D. microstrigiliformis* éste es levemente convexo.

Dimensiones: L 35-52; H 18-29 ($n=2$).

Balech 1988: 48, Lam. 10, 1-3.

Epiteca alta y redondeada, sobresale aproximadamente un tercio en vista lateral. Hipoteca con borde dorsal convexo y ventral recto, formando una cuña en la región posterior (Fig. 4.5 G). Escultura reticular formada por areolas poco profundas de distintos tamaños, aproximadamente 1 de cada 5 con poro. ASI afinándose hacia el extremo posterior. La ASD termina antes de R3 y en la región anterior posee una escultura reticular similar a la de la hipoteca. Aletas cingulares rectas con numerosos radios. Se diferencia de *D. operculata* principalmente por poseer el extremo posterior en forma de cuña, mientras que en *D. operculata* es convexo.

Al igual que *D. operculata*, *D. minuta* presenta características morfológicas que la ubicarían dentro del género *Phalacroma*. Sin embargo, de acuerdo a lo planteado en la descripción de *D. operculata*, en este estudio se considera al taxa previamente descrito como perteneciente al género *Dinophysis*.

Dimensiones: L 54; H 42; Epiteca 16 ($n=3$).

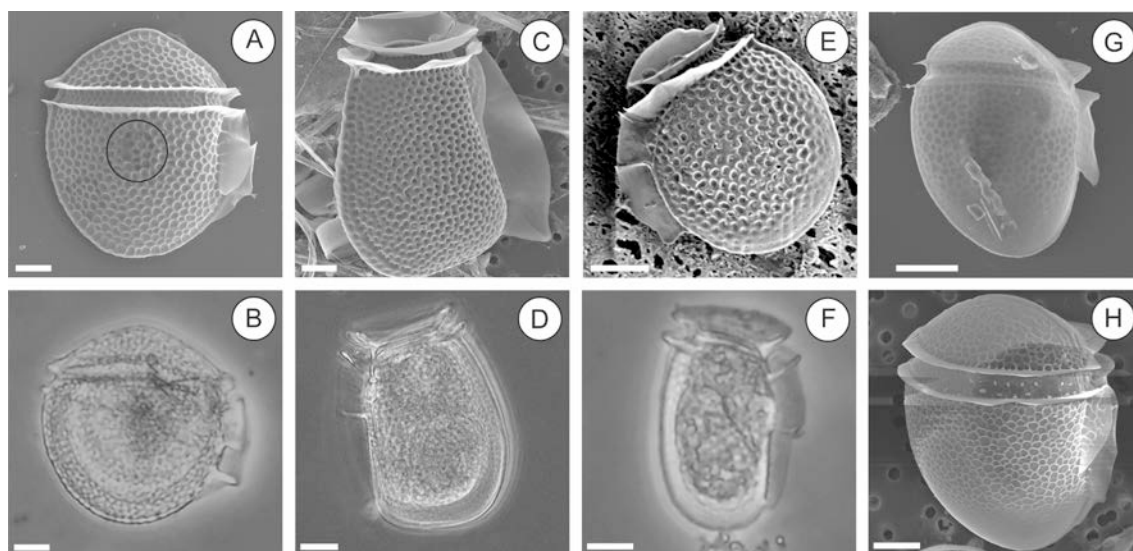


Fig. 4.8: Fotografías tomadas con microscopía electrónica de barrido (A, C, E, G, H) y óptica (B, D, F) de especies del género *Dinophysis* no consideradas productoras potenciales de toxinas. A, B) *D. operculata*, note el círculo de areolas más profundas ubicado dentro de la circunferencia; C, D) *D. truncata*; E) *D. aff. subcircularis*; F) *D. microstrigiliformis*; G, H) *D. minuta* (en H falta el segmento de la ASI desde R2 a R3). Barra de escala: 10 μm .

4.3 Distribución y abundancia del género *Dinophysis* y toxinas asociadas

4.3.1 Campaña de otoño (C1)

Distribución y abundancia

El género *Dinophysis* representó entre 0,2 y 22 % de la abundancia total de los dinoflagelados (promedio= 7 %) en las estaciones en las cuales fue detectado ($n=41$). Se encontraron ocho especies: *D. acuminata*, *D. tripos*, *D. caudata*, *D. norvegica*, *D. truncata*, *D. aff. subcircularis*, *D. operculata* y *D. microstrigiliformis*, aunque en muestras cuantitativas de botella únicamente se detectaron las dos primeras.

Dinophysis acuminata fue la especie más ampliamente distribuida, presente en el 33% de las muestras de botella desde los 38 hasta los 56 °S, aunque en bajas abundancias (20-160 cél. L⁻¹). La máxima densidad celular se detectó en el Golfo San Jorge (Fig. 4.9). Adicionalmente a su detección en muestras de botella, *D. acuminata* se encontró en muestras de red de otras 22 estaciones de muestreo, ubicadas al sur del Mar Argentino y en el Canal de Beagle (E: I1, I3-I5, I9-I11, I14, C17, C18, I22, C27, I30, C29, C35-C37, I32, S38, I38B), en el Golfo San Jorge (E C44) y a los 44 °S (E I46).

La presencia de *D. tripos* estuvo restringida a dos estaciones de muestreo al norte del área de estudio (Fig. 4.9), donde se observó en bajas densidades (40 y 260 cél. L⁻¹). Se detectó además en dos muestras de red correspondientes al norte (E I52) y sur (E I49) de la provincia de Buenos Aires.

D. microstrigiliformis, *D. norvegica*, *D. operculata*, *D. aff. subcircularis* y *D. truncata* se detectaron únicamente en muestras de red en la parte sur del área de estudio (51-56° S), mientras que *D. caudata* se registró únicamente en la parte norte, a los 38° S (Fig. 4.10)

De todas las especies presentes *D. acuminata* se encontró en los rangos de temperatura y salinidad más amplios, presentando la mayor abundancia a 13° C y a una salinidad de 33,4. *D. tripos* y *D. caudata* se encontraron a temperaturas mayores de 17° C con salinidades mayores a 33,8. El resto de las especies se detectaron en aguas con temperaturas por debajo de los 10 °C.

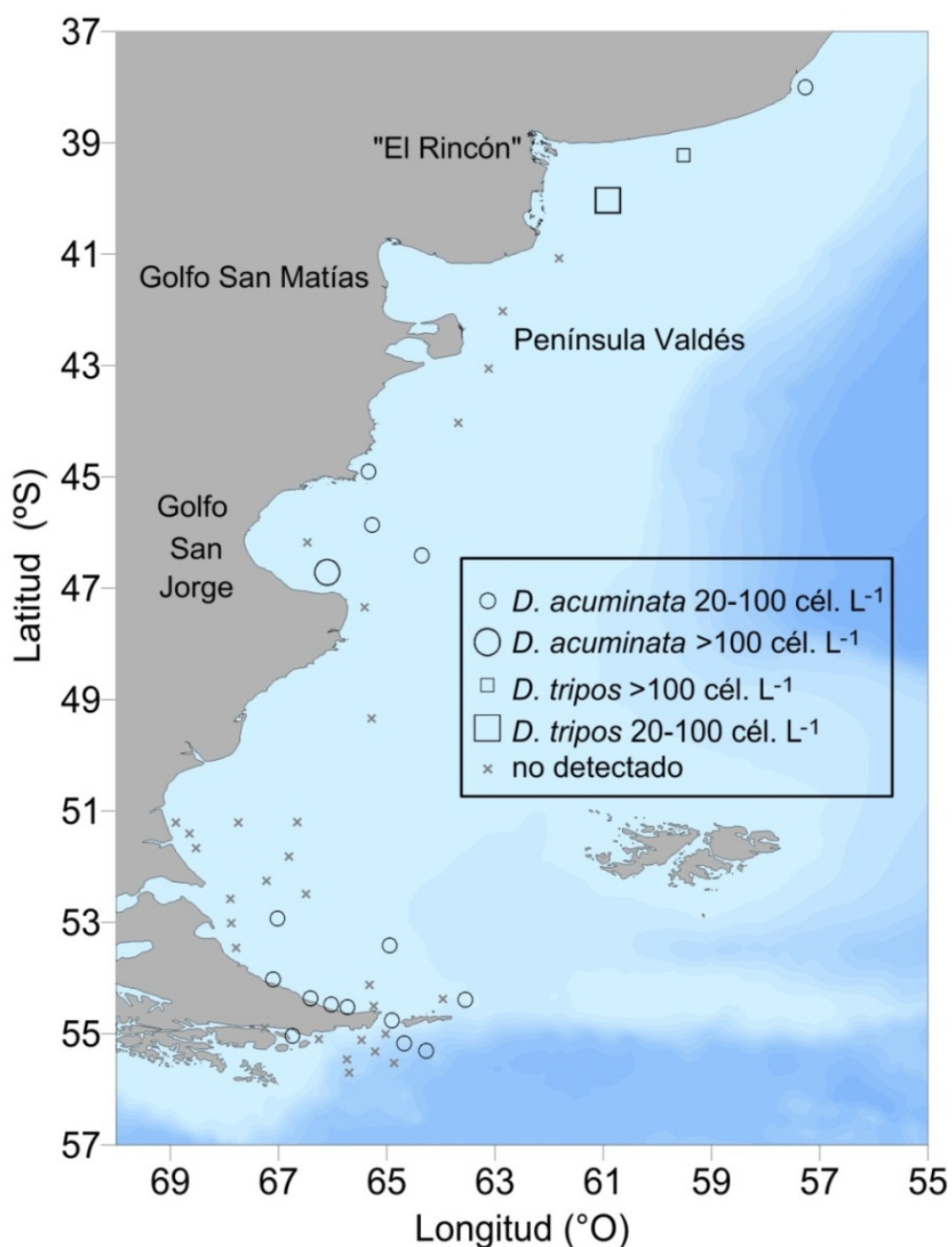


Fig. 4.9: Distribución y abundancia de las especies del género *Dinophysis* detectadas en muestras de botella durante la C1.

Toxinas asociadas

Se detectaron dos análogos de PTX: PTX-2 y PTX-2sa. El análogo más frecuente fue PTX-2, presente en el 66% de las muestras de red, principalmente en la fracción de 20–50 μm en la cual representó en promedio el 86 % de la concentración total de PTX y fue la toxina predominante en el 90 % de las estaciones de muestreo

(Fig. 4.11). Las máximas concentraciones ($200-624 \text{ ng LR}^{-1}$) se encontraron al sur del Mar Argentino, entre los 52 y 53 °S.

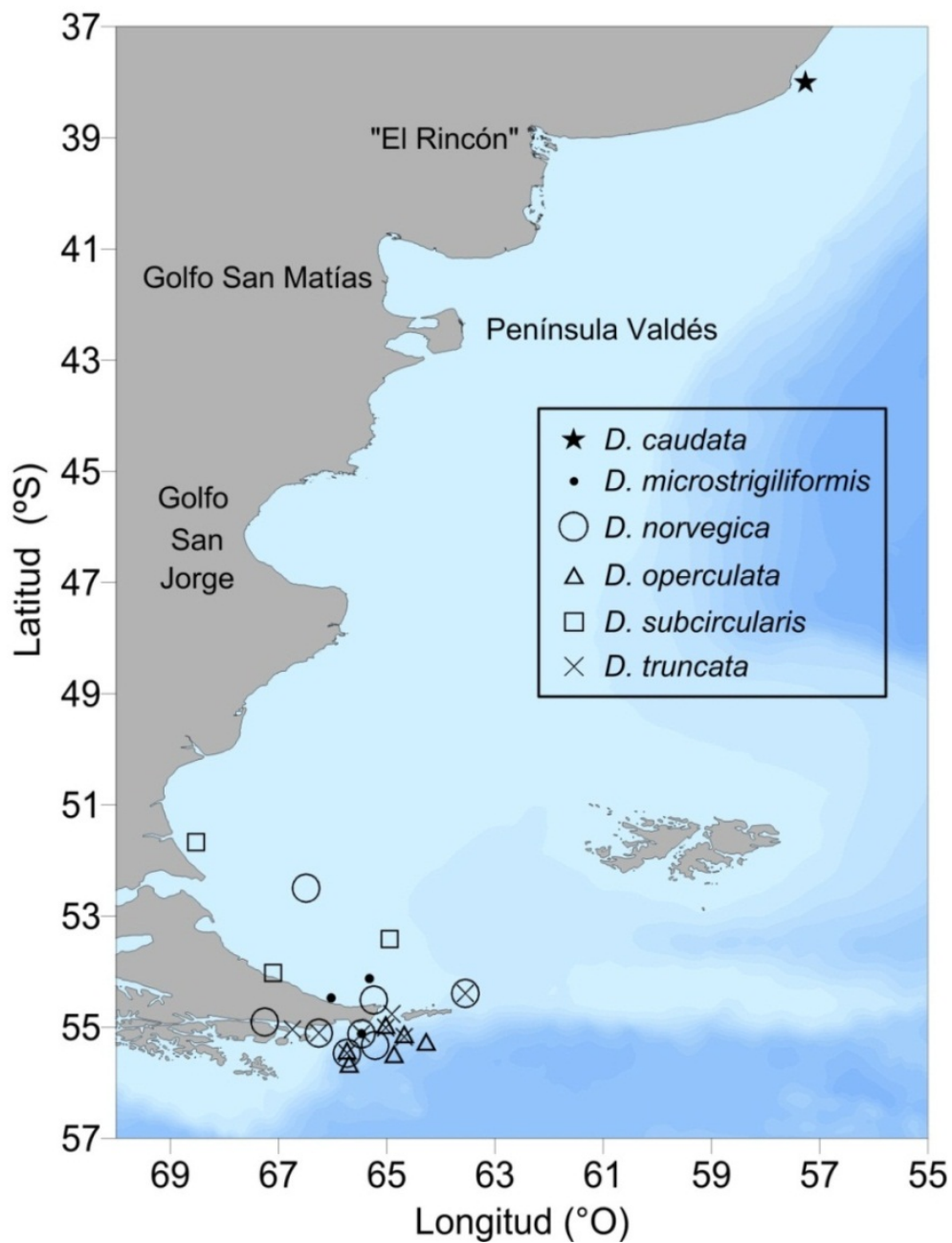


Fig. 4.10: Distribución de las especies del género *Dinophysis* detectadas únicamente en muestras de red durante la C1.

Dinophysis acuminata se observó en todas las estaciones en las cuales se detectó PTX-2 en la fracción de $20-50 \mu\text{m}$ (Fig. 4.12), presentando la densidad celular y la concentración de toxinas una correlación significativa ($r = 0,75$ $p < 0,05$). Las cuotas

celulares de PTX total estimadas para esta especie variaron entre 0,2 y 25 pg cél.⁻¹ ($n = 19$), y los valores máximos se encontraron también al sur del área de muestreo (52–54 °S). En cuatro muestras de la fracción de 50–200 µm (C43, C43N, P45B y C45) en las cuales *D. acuminata* fue la única especie toxígena encontrada se detectaron concentraciones moderadas (104-578 ng LR⁻¹) de PTX-2 y/o PTX-2sa.

El análogo PTX-2sa se registró principalmente en la fracción de 50–200 µm, en la cual dominó el perfil en 3 de las 6 estaciones en las que hubo detección de PTX, representando en esas estaciones del 97 al 100% de las PTX encontradas. La concentración máxima de PTX-2sa (2.396 ng LR⁻¹) superó los máximos para PTX-2 y se detectó al norte del área de muestreo (40 °S). La detección de PTX-2sa estuvo asociada a la presencia de *D. tripos*, coincidiendo los picos de abundancia de esta especie y de concentración de PTX-2sa en la estación I50 (Fig. 4.13). Las cuotas de PTX-2sa estimadas para *D. tripos* fueron de 12 y 234 pg cél.⁻¹.

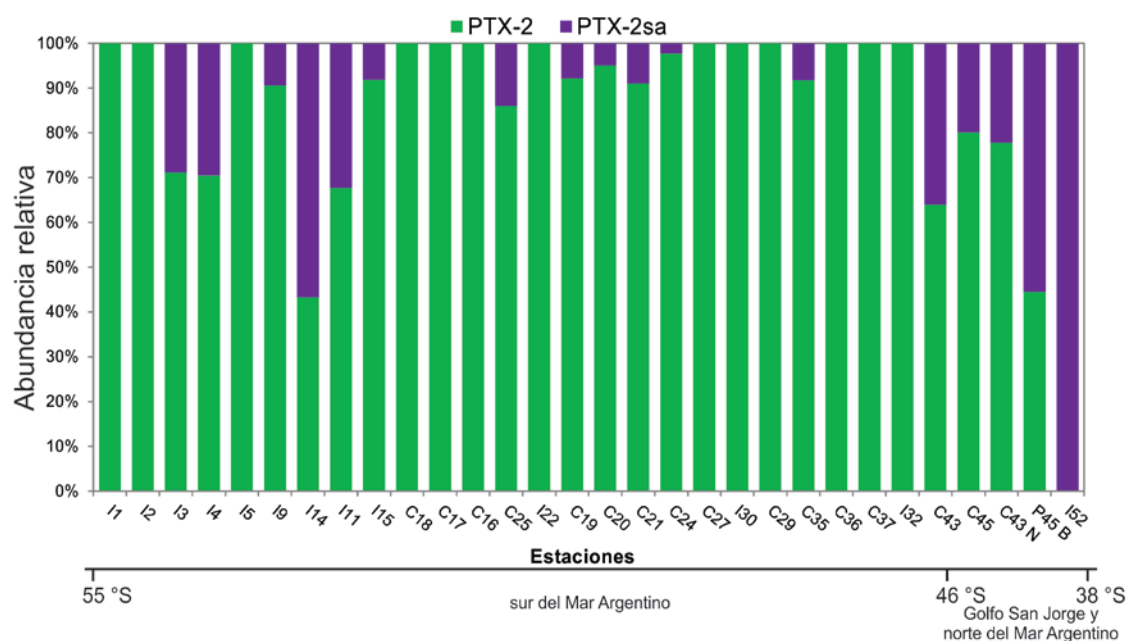


Fig. 4.11: Perfil de toxinas detectado en la fracción de 20-50 µm de muestras de red a lo largo de la C1.

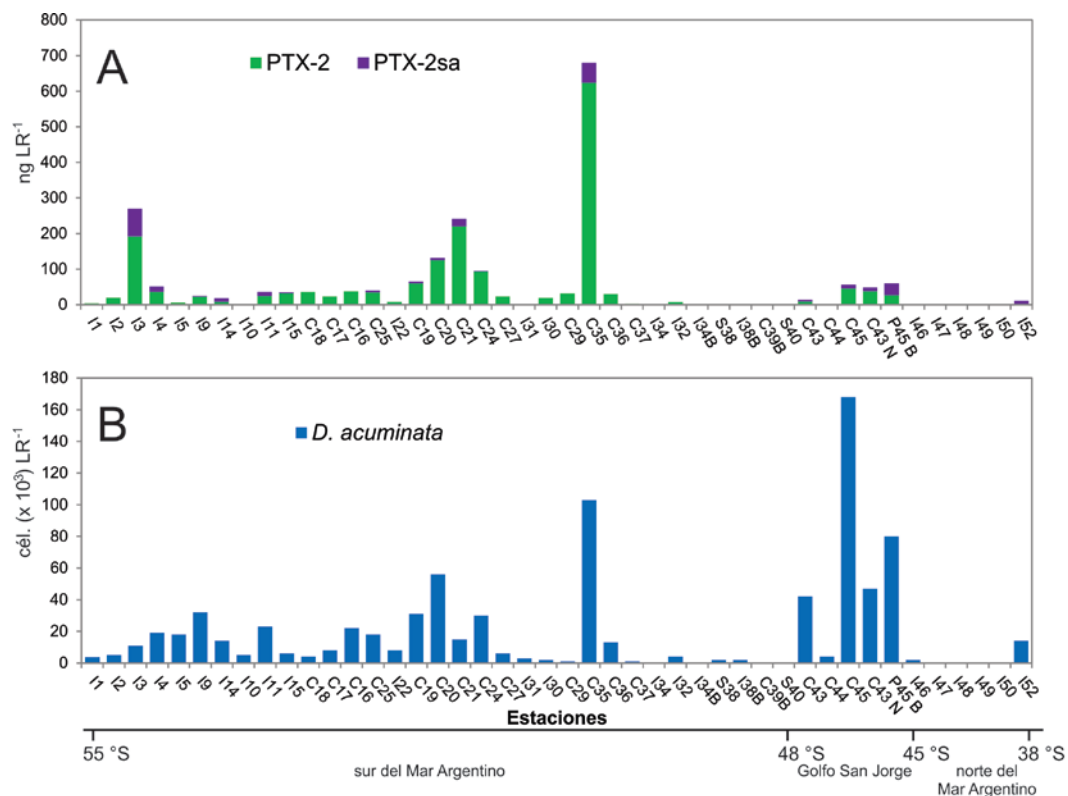


Fig. 4.12: (A) Concentración de toxinas detectadas en la fracción de 20-50 µm de muestras de red y (B) abundancia de células de *Dinophysis* sp. en muestras de red no fraccionadas a lo largo de la C1.

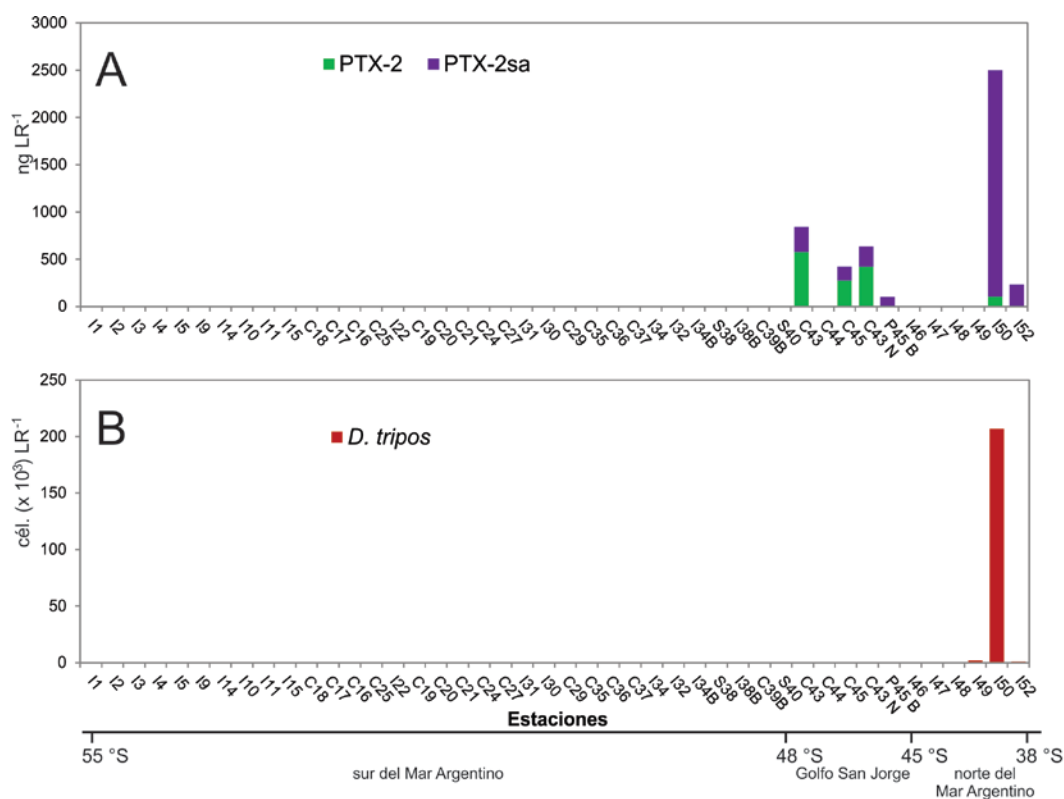


Fig. 4.13: (A) Concentración de pectenotoxinas (PTX) detectadas en la fracción de 50-200 µm de muestras de red y (B) abundancia de células de *Dinophysis* sp. en muestras de red no fraccionadas a lo largo de la C1.

4.3.2 Campaña de verano tardío (C2)

Distribución y abundancia

El género *Dinophysis* representó entre un 0,1 y 3 % de la abundancia total de dinoflagelados (promedio= 1 %) en las estaciones en las cuales fue detectado ($n=11$). Se encontraron únicamente dos especies: *D. acuminata* y *D. tripos*. Esta última fue la especie más abundante y frecuente, presente en el 50% de las muestras de botella en densidades de 20 a 1.560 cél. L^{-1} , aunque su distribución estuvo acotada al Golfo San Matías (Fig. 4.14). *D. tripos* se encontró además en dos muestras de red correspondientes a áreas costeras del sur de la Provincia de Buenos Aires (E 2K2) y al norte de Península de Valdés (E 21K2).

D. acuminata se registró en una única muestra de botella, obtenida frente a Península de Valdés, con una densidad de 20 cél. L^{-1} (Fig. 4.14). Esta especie estuvo presente además en siete muestras de red obtenidas al sur de Provincia de Buenos Aires (E 27K1), en el Golfo San Matías (E: 4-6K2, 9K2, 20K2) y al sur de Península de Valdés (E 29K2). El rango de temperatura en que se encontró *D. tripos* varió entre 14,5 y 18 °C. *D. acuminata* se encontró a temperaturas entre 16 y 18 °C y a una salinidad de 32,2 en la única estación de la pierna K1 en la cual se detectó.

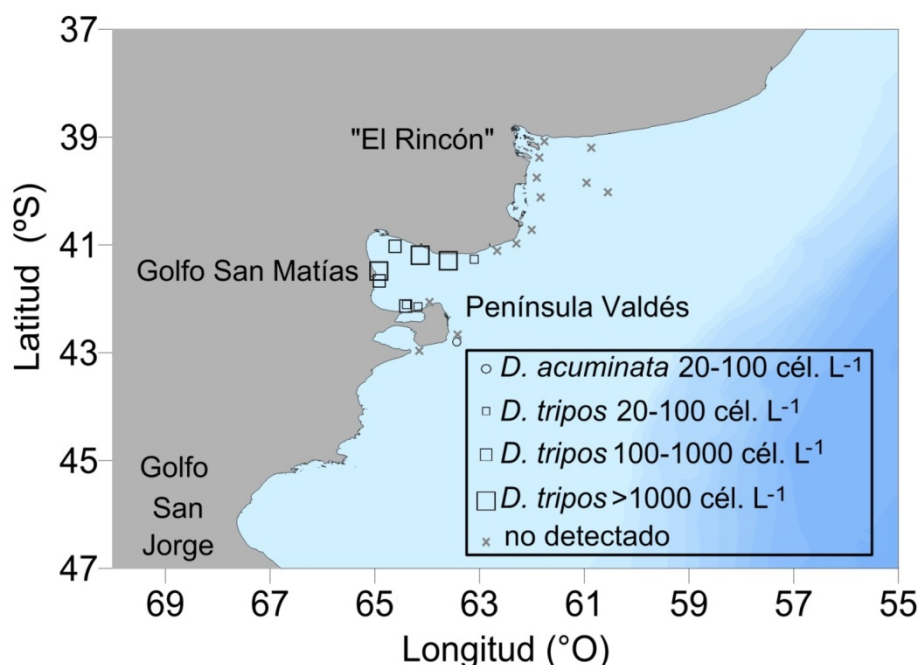


Fig. 4.14: Distribución y abundancia de las especies del género *Dinophysis* detectadas en muestras de botella durante la C2.

Toxinas asociadas

Se detectaron tres análogos de PTX: PTX-2, PTX-2sa y PTX-11. Los mismos predominaron en la fracción de 50–200 μm , en la cual se detectaron en el 50% de las estaciones. La PTX-2sa dominó el perfil en todas las estaciones de muestreo en las cuales se detectaron PTX (Fig. 4.15), representando en promedio el 80% de la concentración de PTX total. Las máximas concentraciones de PTX-2sa (2.441 y 3.002 ng por LR^{-1}) se detectaron en la fracción de 50–200 μm , en dos estaciones costeras ubicadas en la región media del Golfo San Matías (E: 8 y 9 K2). Las concentraciones máximas de PTX-2 y PTX-11, 1.317 y 513 ng por LR^{-1} respectivamente, también se detectaron en la fracción de 50–200 μm y en la misma zona.

Células pequeñas (gametas) y/o típicas de *Dinophysis tripos* se encontraron en todas las estaciones en las cuales se detectaron PTX en la fracción de 20–50 μm (Fig. 4.16) y 50–200 μm (Fig. 4.17); con excepción de la estación 29K2, en la cual se detectaron concentraciones traza de PTX-2 y PTX-2sa en ambas fracciones junto con la presencia de *D. acuminata*. La correlación entre la abundancia de *D. tripos* y las concentraciones de PTX-2 y PTX-2sa en la fracción de tamaño de 50 a 200 μm fue alta y significativa ($r = 0,91$ y $0,96$ $p < 0,05$). Las cuotas celulares de PTX total estimadas para células de *D. tripos*, tanto pequeñas como típicas, variaron entre 0,2 y 2 pg cél.⁻¹ ($n = 14$), mientras que la única cuota calculada para *D. acuminata* fue de 0,04 pg cél.⁻¹.

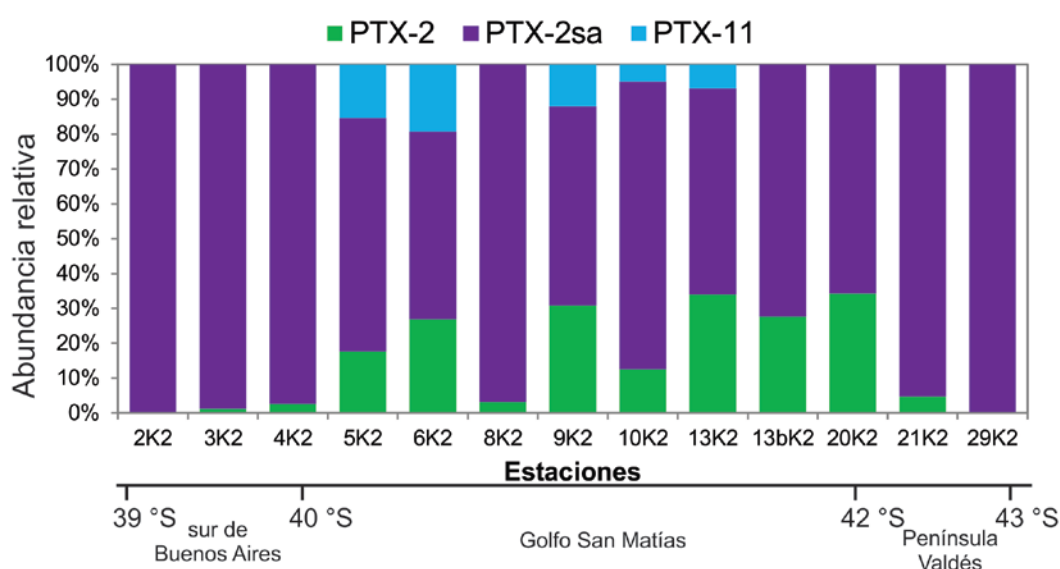


Fig. 4.15: Perfil de toxinas detectado en la fracción de 50-200 μm de muestras de red a lo largo de la C2.

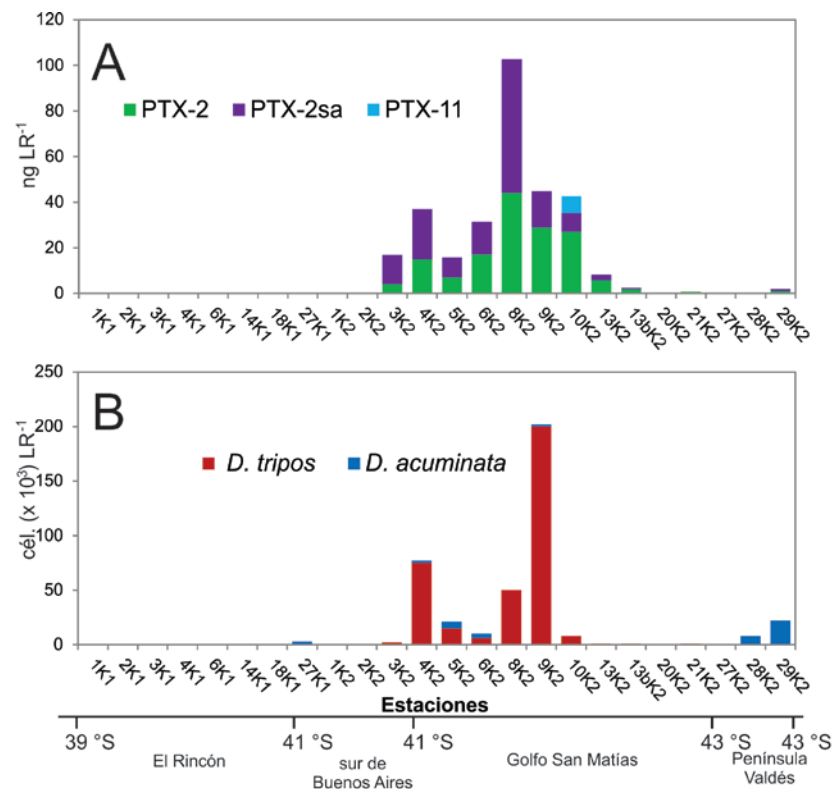


Fig. 4.16: (A) Concentración de pectenotoxinas (PTX) detectadas en la fracción de 20-50 µm de muestras de red y (B) abundancia de células de *Dinophysis* sp. en muestras de red no fraccionadas a lo largo de la C2.

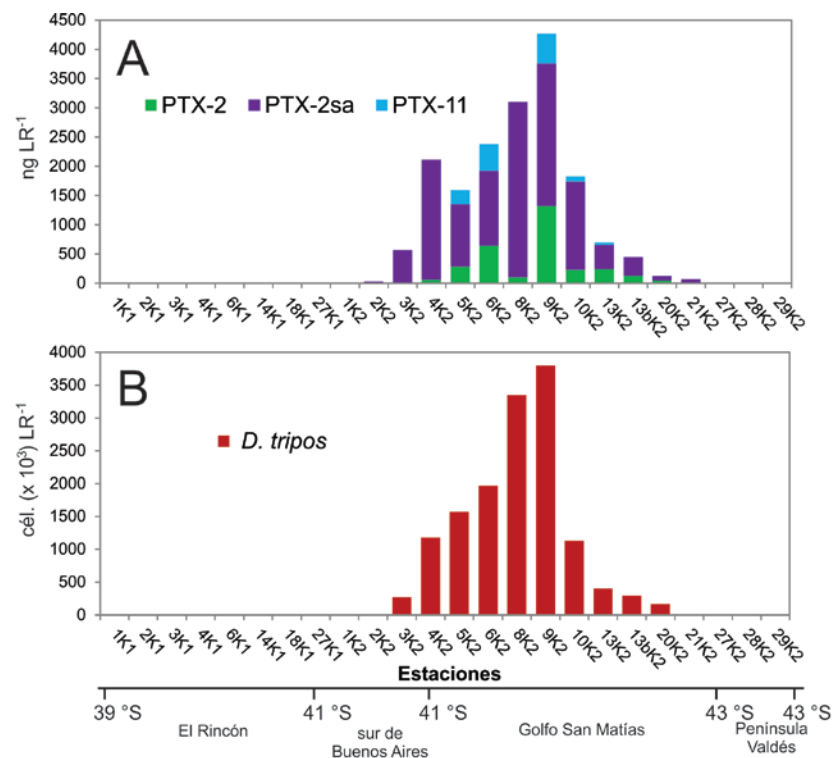


Fig. 4.17: (A) Concentración de pectenotoxinas (PTX) detectadas en la fracción de 50-200 µm de muestras de red y (B) abundancia de células normales de *D. tripos* en muestras de red no fraccionadas a lo largo de la C2.

4.3.3 Campaña de primavera (C3)

Distribución y abundancia

El género *Dinophysis* representó entre un 0,05 y un 1.8 % de la abundancia total de dinoflagelados (promedio= 0,5 %) en las estaciones en las cuales fue detectado ($n=27$). Se encontraron seis especies: *D. acuminata*, *D. tripos*, *D. truncata*, *D. aff. subcircularis*, *D. operculata* y *D. minuta*, sin embargo únicamente las dos primeras fueron detectadas en muestras cuantitativas de botella.

Dinophysis acuminata fue la especie más ampliamente distribuida, estando presente en el 50% de las muestras de botella desde los 40 hasta los 47° S, en abundancias de 20 a 1.680 cél. L⁻¹. Las máximas densidades celulares se encontraron en el talud a los 40 y 44° S y en el Golfo San Jorge y áreas aledañas (Fig. 4.18). Adicionalmente la especie fue detectada en 14 muestras de red correspondientes a estaciones ubicadas en el talud a los 40 °S (E 2), frente a la zona de “El Rincón” (E: 8-12), en el Golfo San Matías (E: 20, 22-24) frente a Península Valdés (E 28) y en el Golfo San Jorge (E: 32-34).

La presencia de *D. tripos* estuvo restringida a tres puntos de muestreo ubicados en el Golfo San Matías (Fig. 4.18) donde presentó una densidad máxima de 40 cél. L⁻¹. En muestras de red se la encontró además en las estaciones 20, 23 y 24, ubicadas también en el Golfo San Matías.

D. truncata, *D.aff. subcircularis* y *D. operculata* fueron detectadas únicamente en muestras de red. Se encontraron distribuidas en aguas del talud, en Península de Valdés y al norte del Golfo San Jorge (Fig. 4.19).

De todas las especies presentes *D. acuminata* se encontró en los rangos de temperatura y salinidad más amplios con la mayor abundancia a 8° C y a una salinidad de 33,8. *D. tripos* se encontró en aguas entre 12 y 14° C con salinidad alrededor de 34. *D. truncata*, *D. aff. subcircularis* y *D. operculata* se detectaron en aguas con temperaturas por debajo de los 12 °C.

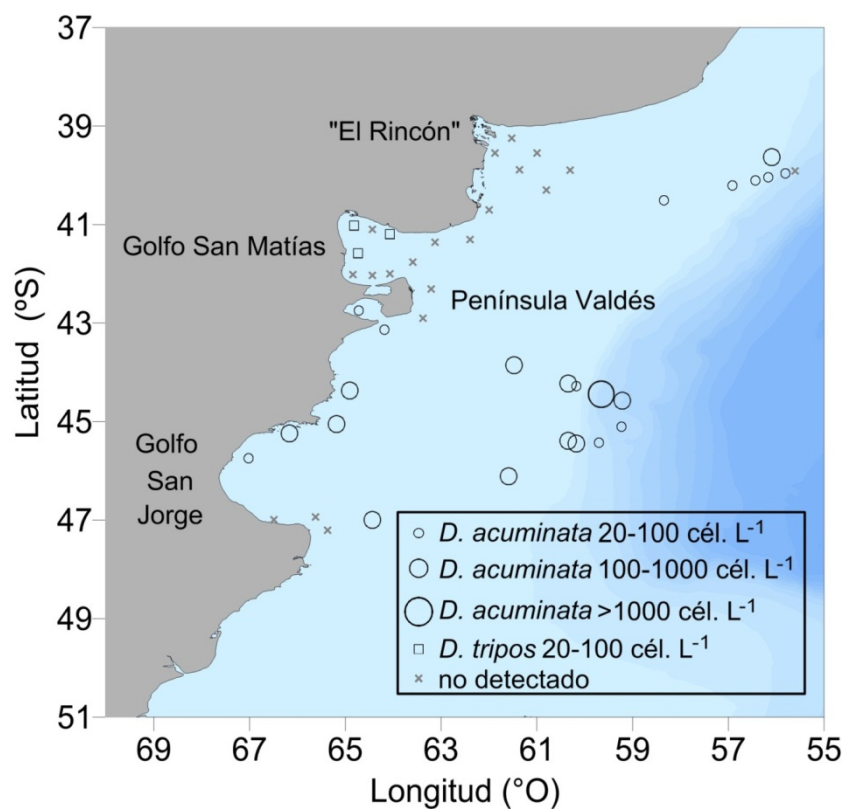


Fig. 4.18: Distribución y abundancia de las especies del género *Dinophysis* detectadas en muestras de botella durante la C3.

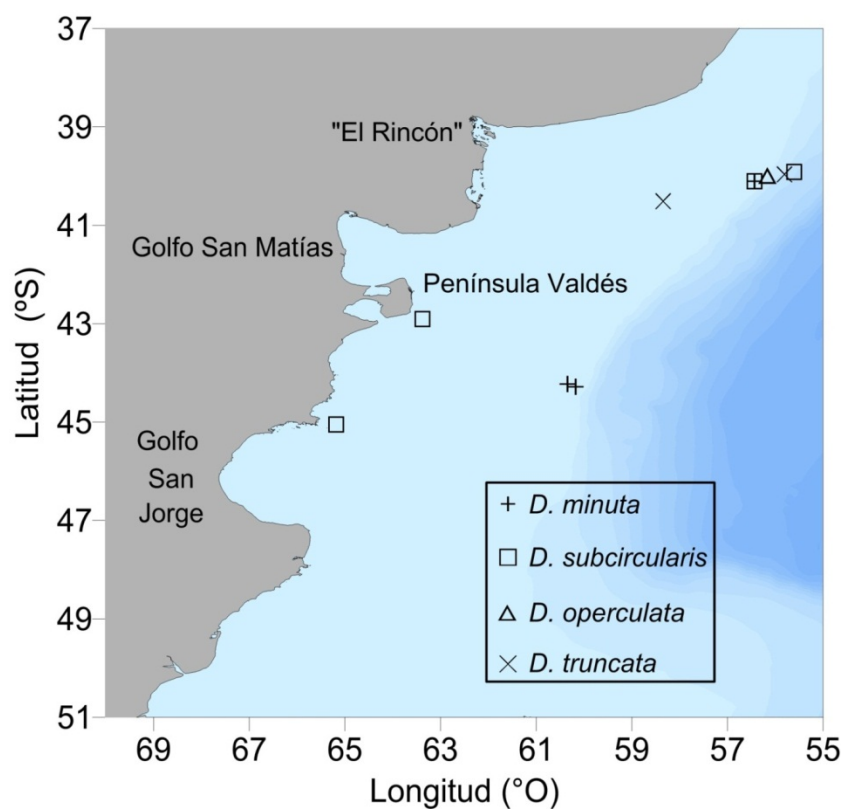


Fig. 4.19: Distribución de las especies del género *Dinophysis* detectadas únicamente en muestras de red durante la C3.

Toxinas asociadas

Se detectaron 3 análogos de PTX (PTX-2, PTX-2sa y PTX-11) y AO, aunque este último únicamente en una muestra de red correspondiente a la fracción de 20-50 μm , colectada en el talud a los $\sim 40^\circ\text{S}$. El análogo más frecuente fue la PTX-2, detectado en el 41% de las estaciones principalmente en la fracción de 20–50 μm , en la cual representó en promedio el 81% de la concentración total de PTX y dominó el perfil del 90% de las estaciones en las que se detectaron PTX (Fig. 4.20). Las máximas concentraciones de PTX-2 (703-997 ng LR^{-1}) se detectaron en aguas del talud entre los 44 y 46 $^\circ\text{S}$. En la misma región se detectaron los máximos de PTX-11, el cual estuvo presente en el 23% de las estaciones y alcanzó concentraciones máximas de 162-214 ng LR^{-1} .

Dinophysis acuminata se encontró en la mayoría de las estaciones donde se detectaron toxinas en las fracciones de 20 a 50 y de 50 a 200 μm , presentando en ambas fracciones una correlación significativa entre células y PTX ($r = 0,60$ y $0,61$ respectivamente $p < 0,05$). En la estación 14 no se encontraron representantes del género *Dinophysis* pero se hallaron análogos de PTX en concentraciones significativas (581 ng LR^{-1}) en la fracción de 20-50 μm (Fig. 4.21-4.22). Por otro lado, hubo algunas estaciones en las cuales se encontraron células de *D. acuminata* pero no se detectaron toxinas. En la mayoría de estos casos las densidades celulares encontradas fueron bajas, excepto para las estaciones 4, 35 y 45. Las cuotas celulares de PTX total calculadas para *D. acuminata* variaron entre 0,01 y 26 pg cél.^{-1} ($n=16$). Los valores más altos coincidieron con la zona de mayores densidades celulares, en aguas del talud a los 46 $^\circ\text{S}$. Adicionalmente se estimó la cuota celular de AO para la única estación en la que fue detectada la toxina y el valor resultante fue de 0.5 pg cél.^{-1} .

4.3.4 Campaña de verano (C4)

Distribución y abundancia

El género *Dinophysis* representó entre el 0,05 y el 0,2 % de la abundancia total de dinoflagelados (promedio= 0,1 %) en las estaciones en las cuales fue detectado ($n=3$). *D. acuminata* fue la única especie del género detectada en muestras de botella, con abundancias de 20 cél. L^{-1} en tres puntos de muestreo ubicados al sur del Golfo San Jorge y frente a la Isla de los Estados (55°S) (Fig. 4.20).

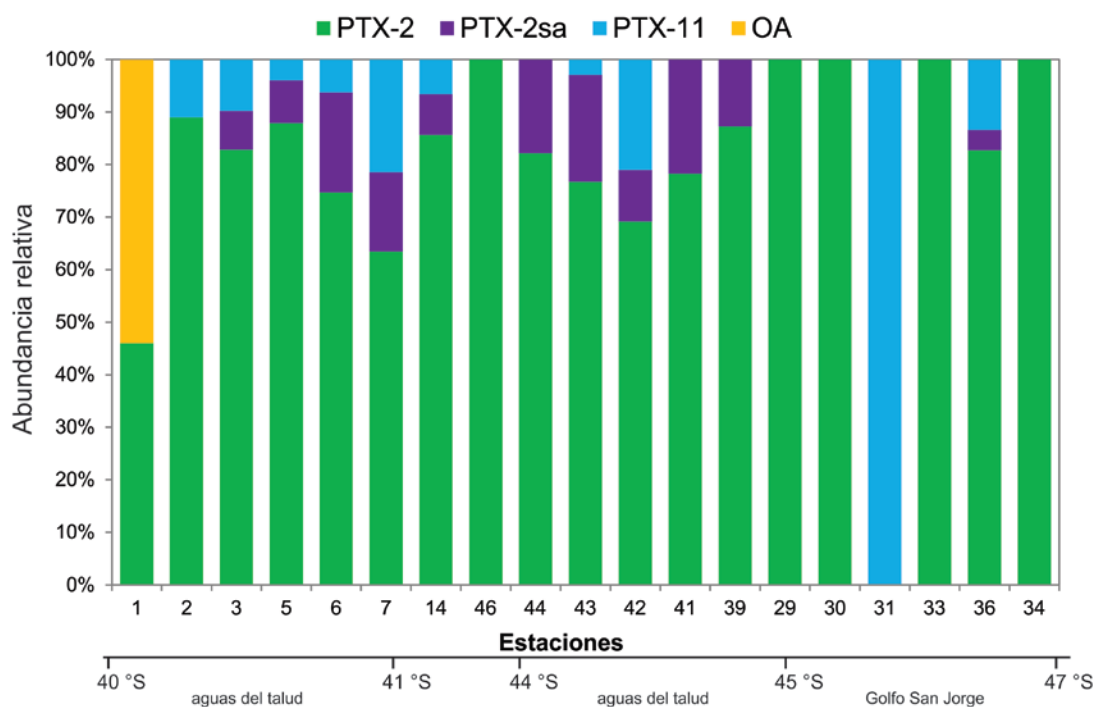


Fig. 4.20: Perfil de toxinas detectado en la fracción de 20-50 μm de muestras de red a lo largo de la C3.

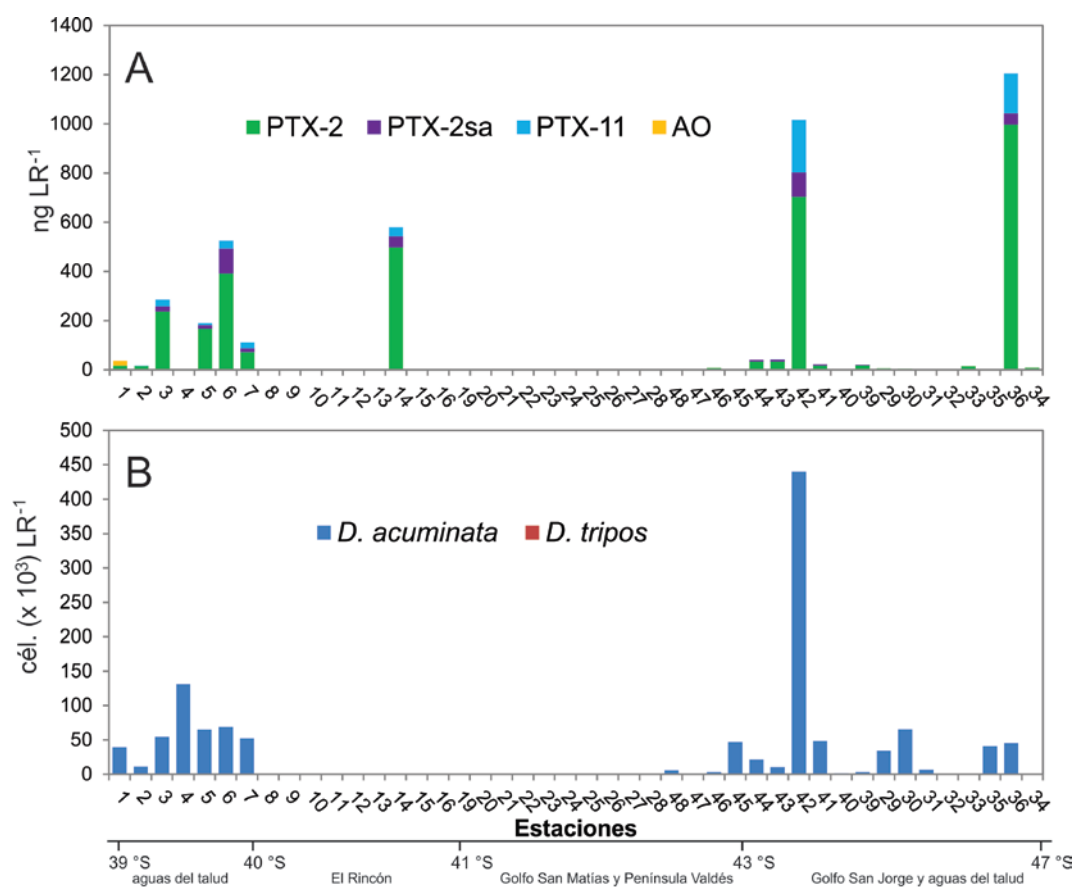


Fig. 4.21: (A) Concentración de toxinas y (B) abundancia de células de *Dinophysis* sp. detectadas en la fracción de 20-50 μm de muestras de red a lo largo de la C3.

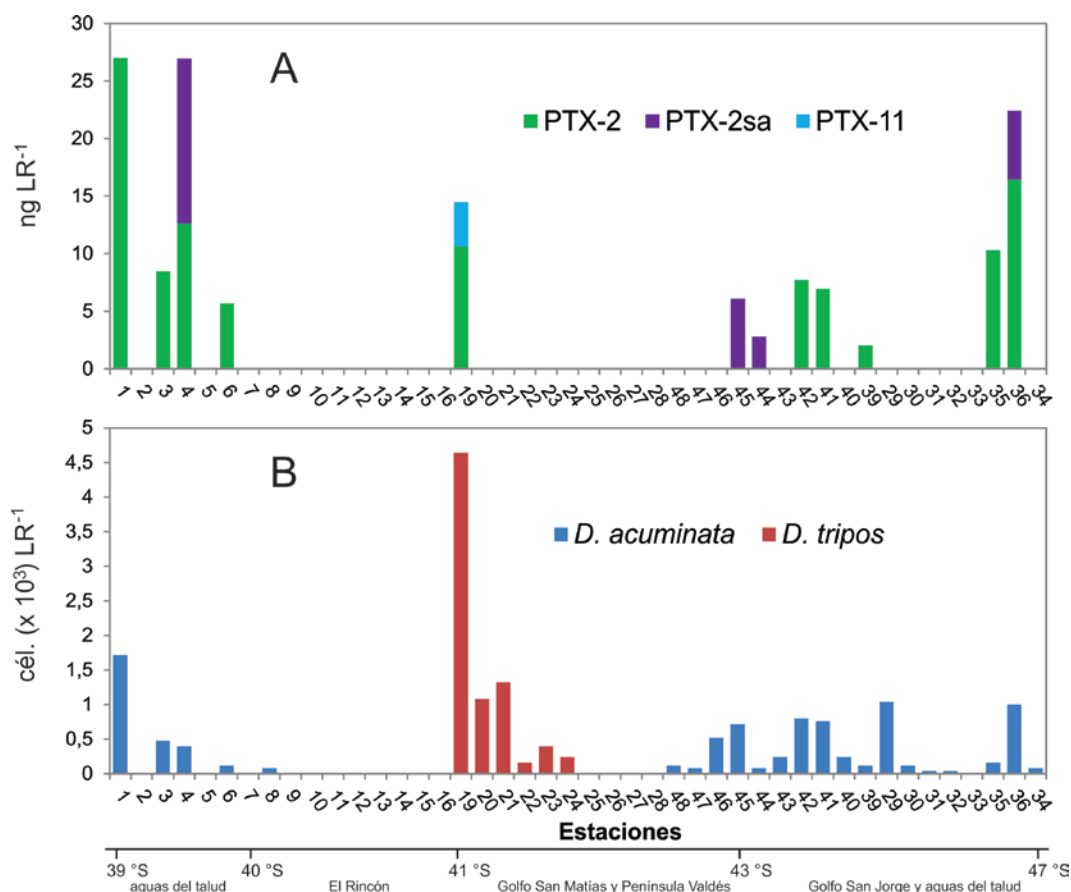


Fig. 4.22: (A) Concentración de toxinas y (B) abundancia de células de *Dinophysis* sp. detectadas en la fracción de 50-200 µm de muestras de red a lo largo de la C3.

Esta especie se encontró además en otras dos muestras de red colectadas al sur del Golfo San Jorge (E: 7 y 9). *D. truncata* y *D. microstrigiliformis* se encontraron en una muestra de red correspondiente a la estación 13, al sur del área de estudio (55°S).

D. acuminata se halló entre 5 y 13° C de temperatura y en salinidades de 33 a 34. *D. truncata* y *D. microstrigiliformis* se hallaron en aguas a 8 °C y a una salinidad de 33,5.

Toxinas asociadas

Se detectaron PTX-2 y AO, aunque ambas toxinas se encontraron en concentraciones menores a 1 ng LR⁻¹. La PTX-2 fue detectada en cinco de las siete estaciones de muestreo en la fracción de 20–50 µm y en dos estaciones en la fracción de 50–200 µm, todas ubicadas al sur de los 47°. El AO se detectó en dos estaciones ubicadas a los 55 °S (E: 13 y 14), en la fracción menor e intermedia, respectivamente.

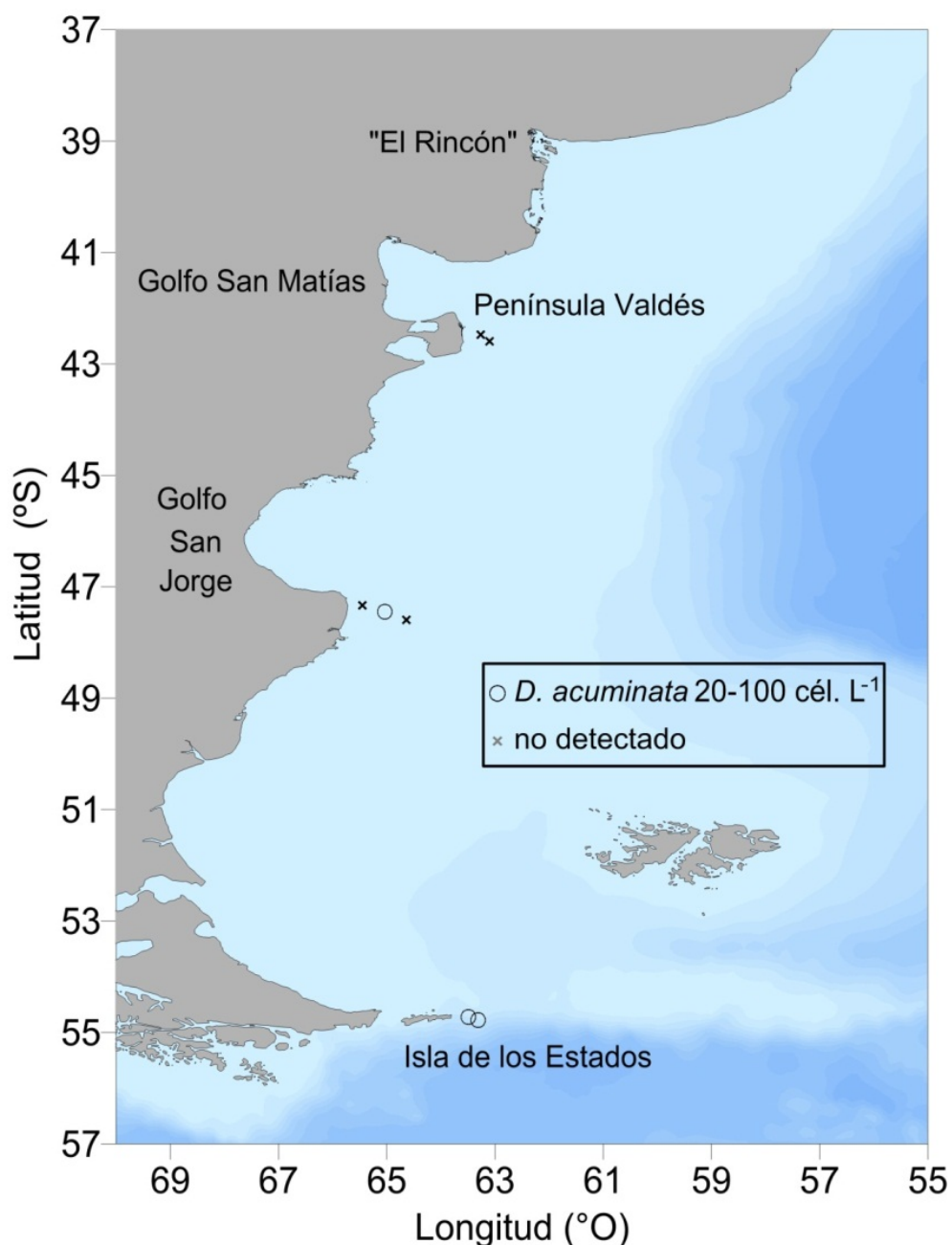


Fig. 4.23: Distribución de las especies del género *Dinophysis* detectadas en muestras de botella durante la C4

Dinophysis acuminata se encontró en todas las muestras de red en las que se hallaron toxinas (Fig. 4.24), sin embargo la correlación entre células y toxinas no fue significativa. Las cuotas celulares calculadas fueron $\leq 0,001$ pg cél.⁻¹ para la PTX-2 ($n=4$) y 0,05 para el AO ($n=1$). No se encontraron especies de *Dinophysis* mayores a 50 μm , por lo tanto no se realizaron estimaciones de cuotas celulares para las toxinas encontradas en la fracción de 50–200 μm .

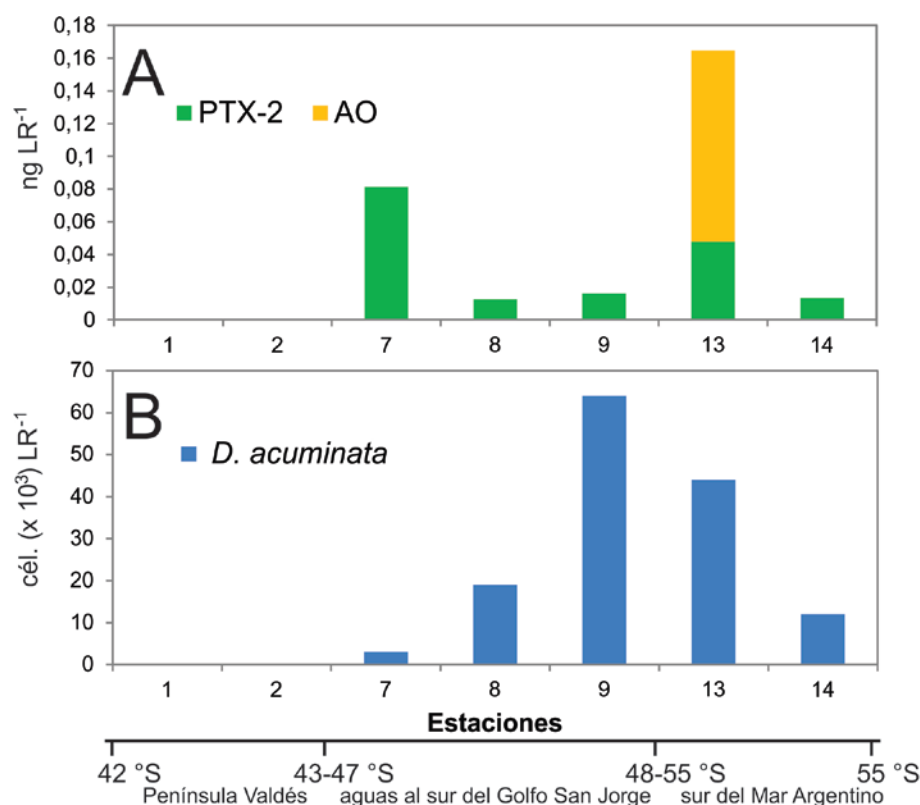


Fig. 4.24: (A) Concentración de toxinas y (B) abundancia de células de *Dinophysis* sp. detectadas en la fracción de 20-50 µm de muestras de red a lo largo de la C4.

4.4 Discusión y Conclusiones

El género *Dinophysis* representó un componente frecuente del fitoplancton durante las cuatro expediciones, mostrando además una amplia distribución latitudinal desde los ~38 a los ~55,5 °S, observándose tanto en aguas de la plataforma continental como en el talud. Sin embargo, en términos cuantitativos representó un componente minoritario de los dinoflagelados (<2 %), alcanzando densidades máximas de ~2000 cél. L⁻¹.

La especie más frecuente a lo largo de las cuatro campañas fue *D. acuminata*, lo cual concuerda con datos previos para el Mar Argentino (Balech, 1988; Sar et al., 2010; Negri et al., 2013; Sunesen et al., 2014). Esta especie fue el taxón dominante del género durante la C1 y C3, y el único presente en la C4, presentando las densidades celulares máximas al sur del área de estudio, en aguas del talud continental y en el Golfo San Jorge, a temperaturas superficiales entre 8 y 13 °C. El patrón de distribución encontrado para *D. acuminata*, con predominio en aguas de plataforma al sur de los 42 °S y en

aguas de la plataforma y del talud, coincide con la predominancia de esta especie en aguas sub-antárticas a temperaturas inferiores a los 14 °C, señalada por Balech (1988). El rango de salinidad (33.2 a 33.9) en el cual se encontraron las máximas densidades de *D. acuminata* corresponde a aguas de la plataforma continental, las cuales se caracterizan principalmente por ser aguas sub-antárticas levemente diluidas por descargas continentales de agua dulce (Piola & Falabella, 2009).

En las muestras de nano y microplancton fraccionadas (C3) provenientes de lances de red, la gran mayoría (87-100%) de las células de *D. acuminata* se encontraron en la fracción menor (20–50 µm), lo cual coincide con sus dimensiones celulares (L 36–48 µm; H 29–42 µm). Sin embargo, un pequeño porcentaje (en promedio el 2%) fue detectado en la fracción de 50–200 µm, probablemente como resultado de la obstrucción parcial de la red causada por altas concentraciones celulares de nano y microplancton. Esto podría explicar la presencia de toxinas en la fracción de 50–200 µm durante las C1 y C4 en estaciones en las cuales *D. acuminata* fue la única especie tóxica del género encontrada. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de una transferencia de toxinas a través de la red trófica, resultando en la concentración de toxinas en depredadores de *Dinophysis*. En este sentido, la presencia de PTX ha sido detectada en células aisladas de dinoflagelados heterótrofos como *Protoperdinium divergens*, *P. depressum* y *P. crassipes*, los cuales se habían alimentado previamente de *Dinophysis* spp. (Miles et al., 2004). Asimismo, diferentes especies de copépodos y tintinidos, como *Oithona nana*, *Temora longicornis* y *Favella serrata*, se alimentan activamente de especies del género *Dinophysis* y pueden transferir toxinas como el AO a niveles superiores de la red trófica (Maneiro et al., 2000). Como una tercera alternativa, la presencia de PTX en estaciones donde no se encontraron células de ningún productor potencial, por ejemplo la estación 14 de la C3 y en varias estaciones de la C1, podría deberse a la presencia de toxinas adheridas a materia orgánica particulada que puede quedar retenida durante el muestreo con la red de nano y microplancton (Pizarro et al., 2008; Fux et al., 2011).

D. acuminata se asoció con la presencia de PTX-2 en tres de las cuatro campañas realizadas; y con AO en dos de las únicas tres estaciones de muestreo en las que fue detectado. Adicionalmente, PTX-11 fue detectada junto con *D. acuminata* durante la C3. Las cuotas celulares de PTX total estimadas para *D. acuminata* mostraron un rango desde 0,01 a 26 pg cel⁻¹. Rangos similares de variabilidad en cuotas celulares de PTX han sido citados para diferentes poblaciones de dinoflagelados, como

es el caso de *D. acuminata* en las costas este y oeste del Mar del Norte (Krock et al., 2008a) y de poblaciones naturales de las Rías de Galicia (Fernández et. al., 2006). Las cuotas de PTX total estimadas para *D. acuminata* fueron mayores hacia el sur del área de estudio y en aguas del talud, lo cual podría estar relacionado con las bajas temperaturas del agua en estas zonas. Kamiyama et al. (2010) mostraron que existe una relación directa entre la temperatura y el contenido celular promedio de PTX-2 en cultivos de *D. acuminata*, encontrándose lo máximos contenidos de PTX-2 a la menor temperatura (10 °C).

Un hecho llamativo fue la detección de concentraciones moderadas de *D. acuminata* en muestras de red ($41-131 \times 10^3$ cél. LR⁻¹) durante la C3, en las cuales no se detectaron toxinas. Esto podría implicar la existencia de cepas no toxígenas en poblaciones naturales, lo cual ha sido observado previamente en USA para *D. norvegica* (Morton, 2000) y en Chile para *D. acuminata* (Clément et al., 1994). Alternativamente, la ausencia de toxinas podría ser una consecuencia de su pérdida causada por la ruptura o daño de las células durante el pasaje de las muestras a través de los distintos tamices (Johansen & Rundberget, 2006; Pizarro et al., 2008). Sin embargo, el muestreo durante todas las expediciones se realizó bajo las mismas condiciones (velocidad y temperatura de centrifugación, tiempo de manipulación de la muestra) y de forma tal de evitar y/o minimizar cualquier pérdida de material.

Dinophysis tripos fue la segunda especie en relevancia, en cuanto a densidades celulares, hallada en este estudio. Las máximas abundancias se detectaron a temperaturas ~17 °C, lo cual concuerda con la ocurrencia de esta especie en mares templado-tropicales (Reguera et al., 2012). Su distribución se encontró acotada al norte de los ~42 °S y sus mayores densidades se registraron en verano tardío y en la zona norte del Golfo San Matías, el cual se caracteriza por la presencia de un marcado frente de marea hacia la región media del golfo, delimitando una zona estratificada hacia el norte y otra de mezcla vertical hacia el sur (Guerrero & Piola, 1997; Gagliardini & Rivas, 2004; Palma et al., 2004; Tonini et al., 2007). Asimismo, la presencia de *D. tripos* se ha registrado durante monitoreos de fitoplancton nocivo de los golfos norpatagónicos (San Matías, San José y Nuevo), realizados entre los años 2009 y 2011; aunque esta especie fue observada principalmente durante otoño e invierno (Gracia Villalobos et al., 2015).

A partir del análisis morfológico detallado de *D. tripos* se observó la presencia de diferentes morfotipos de la especie en la mayoría de los sitios de muestreo. Estos

morfotipos han sido previamente descriptos para *D. tripos* y otras especies del género, y son considerados como gametos o estadios intermedios entre células vegetativas y reproductivas (Reguera & González-Gil, 2001). Asimismo, la detección de células recientemente divididas durante la C2, diferenciables por la falta del segmento anterior o posterior de la ASI, puede ser un indicio de la presencia de una población en crecimiento (Rodríguez et al., 2012).

La presencia de *D. tripos* se encontró correlacionada significativamente con la detección de PTX en la C2, principalmente con PTX-2sa, tanto en la fracción de 20-50 μm (en la cual se hallaron células intermedias y pequeñas de la especie) como en la de 50-200 μm (en la que se encontraron células típicas). Esta asociación entre *D. tripos* y PTX concuerda con el perfil descrito para poblaciones naturales de la especie en los Golfos San José y Nuevo, el cual estuvo caracterizado por la detección de PTX-2 y PTX-11 (Gracia Villalobos et al., 2015). La producción de PTX-2 por parte de *D. tripos* ha sido observada además en otras regiones del mundo como España y Japón (Rodríguez et al., 2012; Nagai et al., 2013). La cuotas celulares de PTX total calculadas para *D. tripos* ($0,2\text{-}12 \text{ pg cél.}^{-1}$) se encuentran por debajo de las obtenidas para cultivos japoneses (0.8 ± 29.1 al comienzo de la incubación y $1235.6 \pm 96.1 \text{ pg cél.}^{-1}$ al final) por Nagai et al. (2013), y también de las calculadas a partir de muestras de campo ($45\text{-}90 \text{ pg cél.}^{-1}$) y cultivo ($179\text{-}232 \text{ pg cél.}^{-1}$) en las Rías gallegas (Rodríguez et al., 2012).

Un hallazgo novedoso durante la C1 y C2 fue la fuerte asociación entre *D. tripos* y PTX-2sa, ya que usualmente el análogo más frecuente en los perfiles de *Dinophysis* es la PTX-2 (Reguera, 2014 y citas incluidas). Esto se debe a que la PTX-2sa se encuentra asociada comúnmente a la hidrólisis enzimática que ocurre en los moluscos al metabolizar PTX-2 durante la digestión de células de *Dinophysis* que contengan la toxina (Miles et al., 2004; Wilkins et al., 2006). Alternativamente, la conversión de PTX-2 a PTX-2sa puede deberse a cambios en el pH causados por la ruptura de las células de *Dinophysis* (Fernández et al., 2006), lo cual puede ocurrir durante la toma y/o transporte de muestras (Takahashi et al., 2007). No obstante, esta última explicación puede ser excluida en el caso de las muestras analizadas durante el presente estudio, ya que en las muestras de la fracción menor de la C1 en la cuales *D. tripos* no pudo estar presente, al menos en altas densidades celulares, dadas sus dimensiones ($\geq 79 \mu\text{m}$), la PTX-2 fue la toxina más abundante, en asociación con *D. acuminata*. Como las muestras fueron tratadas de igual manera durante toda la expedición sería de extrema rareza que la conversión de PTX-2 a PTX-2sa haya ocurrido únicamente en las muestras

de la fracción de 50-200 μm en las que *D. tripos* estuvo presente junto con la detección de PTX-2sa. A partir de estos resultados se puede concluir que *D. tripos*, a diferencia de otras especies del género, es capaz de metabolizar PTX-2 a PTX-2sa, o que la biosíntesis de la primera toxina es simplemente parte de una vía metabólica paralela y la PTX-2sa es el principal producto metabólico. Como alternativa a la producción de PTX-2sa *de novo* por parte de *D. tripos* es válido plantear la posibilidad de que esta especie se haya alimentado previamente del productor originario de PTX-2, como por ejemplo *D. acuminata*, y que por medio de reacciones enzimáticas haya hidrolizado la PTX-2 a PTX-2sa (MacKenzie et al., 2012). Sin embargo, a pesar de que diversos dinoflagelados han sido observados alimentándose de otros organismos del plancton incluyendo otros dinoflagelados (Tillmann, 2004; Park et al., 2006; Nishitani et al., 2008;), hasta el momento esta conducta alimenticia no ha sido reportada para *D. tripos*. Una tercera opción para explicar la presencia de las altas concentraciones de PTX-2sa encontradas a lo largo de la C2 es la transmisión y consecuente metabolización de PTX-2 a través de la cadena trófica. Con la finalidad de explorar esta posibilidad se analizaron los posibles depredadores de *Dinophysis* presentes en las muestras pertinentes. Los resultados incluyeron la detección de varios organismos como tintinidos (Ej. *Favella ehrenbergii* y *F. serrata*), ciliados (*Tiarina fusus*) y dinoflagelados (*Noctiluca* sp.) como posibles depredadores, pero no se observó una correlación significativa entre su abundancia y la concentración de PTX-2sa (Fabro et al., 2015).

Entre las especies del género *Dinophysis* halladas a lo largo de las cuatro expediciones realizadas, la detección de *D. norvegica* es de particular importancia por ser el primer registro de la especie para el Atlántico sud-occidental. Considerando el extenso trabajo realizado por el Dr. Balech sobre la caracterización y abundancia de dinoflagelados en el Atlántico sud-occidental (Balech, 1988), el hecho de que *D. norvegica* no haya sido reportada con anterioridad en el área puede indicar una introducción reciente de la especie al Mar Argentino. Alternativamente, es probable que la especie no haya sido detectada previamente como resultado de sus bajas densidades celulares, ya que durante este estudio solo fue observada con bajas abundancias relativas en muestras de red. Los registros de *D. norvegica* estuvieron restringidos al sur del área de estudio (~ 52 - $55,5$ °S) y a bajas temperaturas (<9 °C), lo cual concuerda con la distribución mundial de la especie en zonas de aguas templado-frías del hemisferio norte, tales como el Mar Báltico, el Mar de Noruega, el Mar del Norte y el Ártico (Okolodkov & Dodge, 1996; Meyer-Harms et al., 1998; Edvardsen et al., 2003; Jansen

et al., 2006). A pesar de que esta especie es reconocida mundialmente por su capacidad de producción de toxinas, incluidas el AO, los resultados del presente estudio no permiten una asociación clara entre *D. norvegica* y toxinas, debido a que se registró siempre en bajas densidades celulares y en co-ocurrencia con otras especies tóxicas del género halladas en mayores abundancias.

Dinophysis caudata fue la cuarta especie tóxica del género hallada en este estudio, con un único registro al norte del área de muestreo (38 °S) en aguas a una temperatura de ~19 °C, lo cual coincide con su distribución mundial en aguas templado-cálidas (Taylor, 1976). Debido a la baja densidad celular de *D. caudata* y a su co-ocurrencia con otras especies más abundantes no pudo establecerse su asociación con la presencia de toxinas.

La observación de varias especies tóxicas de *Dinophysis* coincidentes con la casi ausencia de AO y DTX fue recurrente a lo largo de las cuatro expediciones realizadas. De hecho, de las 121 estaciones de muestreo que conformaron este estudio, se encontraron representantes tóxicos del género en 94 estaciones, mientras que el AO fue detectado sólo en tres de ellas y en bajas concentraciones y las DTX no se hallaron en ninguna estación. Por otro lado, las PTX fueron frecuentes a lo largo de las 4 campañas y presentaron una amplia distribución, hallándose en 71 estaciones de muestreo. Esta situación se asemeja a la encontrada por Gracia Villalobos et al. (2015) en los golfos norpatagónicos durante monitoreos en los cuales se detectaron PTX pero no AO ni sus derivados. Asimismo, en un estudio llevado a cabo a lo largo de la costa chilena se observó una amplia distribución de PTX y una ausencia total de AO, mientras que DTX-1 se encontró en una área reducida y en sólo 3 estaciones (Trefault et al., 2011). De igual modo, en otro estudio realizado al norte de Chile, no se detectó AO ni DTX, mientras que sí se observó la co-ocurrencia de *D. acuminata* y PTX-2 (Krock et al., 2009a). A su vez células de *D. acuminata* aisladas de Bahía Inglesa (Chile) mostraron grandes cantidades de PTX-2 (180 pg cél.⁻¹) pero no se detectaron AO ni DTX (Blanco et al., 2007), al igual que en el caso de células de la misma especie aisladas del estuario Reloncaví, Chile (Fux et al., 2011).

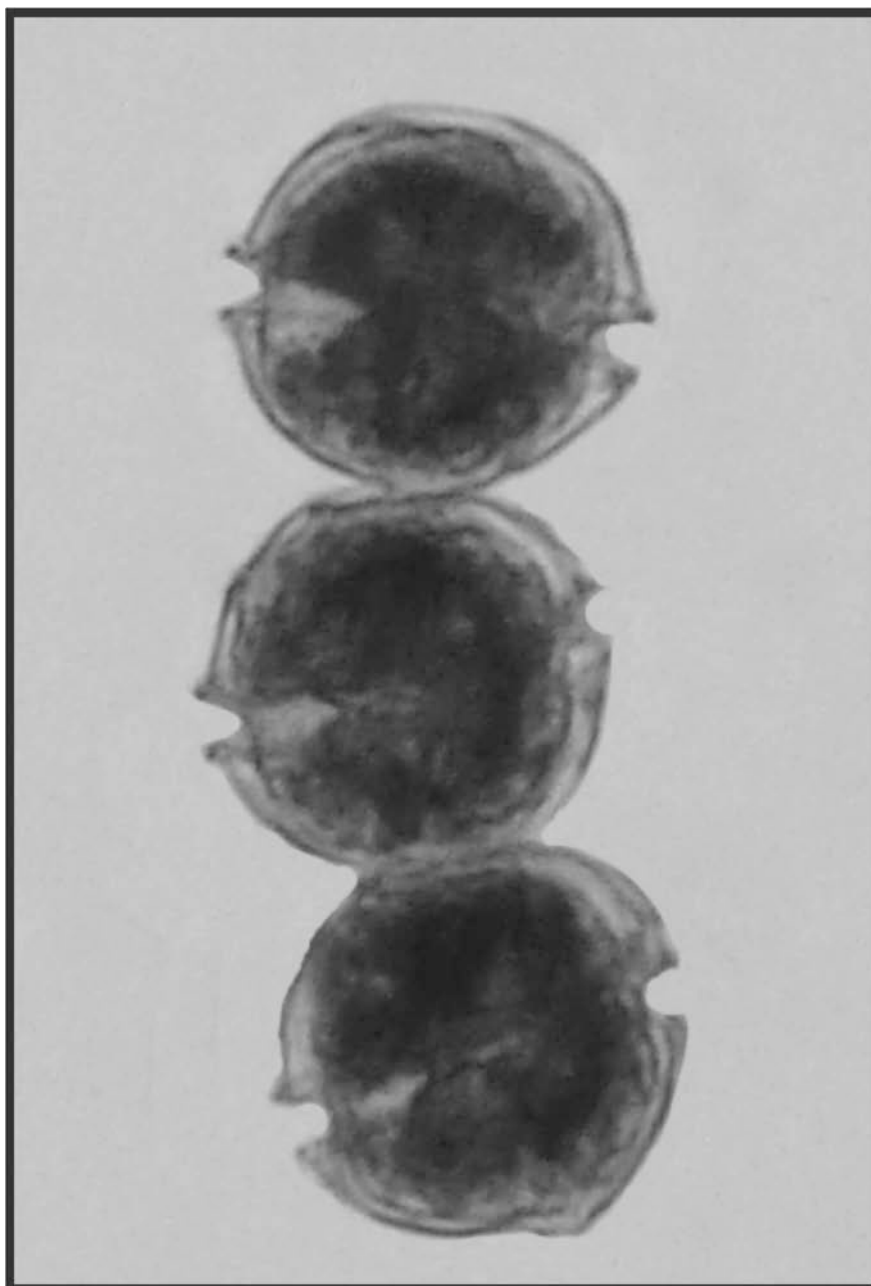
La mencionada predominancia en la producción de PTX sobre el AO y sus derivados también parece ser un patrón recurrente en cepas de *D. acuminata* de otras regiones del mundo. Concentrados celulares de esta especie provenientes de Nueva Zelanda mostraron una proporción PTX/DTX >22 (MacKenzie et al., 2005). Así también, siete cepas danesas de *D. acuminata* produjeron exclusivamente PTX-2

(Nielsen et al., 2012) y un cultivo de la misma especie aislado de Massachusetts (USA), expuesto a distintos tratamientos de irradiancia (luz y oscuridad), mostró un contenido celular de PTX-2 un orden de magnitud mayor que el de AO y DTX en ambos tratamientos (Smith et al., 2012). Sin embargo, también se han registrado cepas con perfiles tóxicos dominados por AO y/o DTX en el este de Europa (Moroño et al., 2003; Marcaillou et al., 2005), como es el caso de células de *D. acuminata* obtenidas a partir de concentrados de agua del fiordo Limfjord, en Dinamarca (Jørgensen & Andersen, 2007). Por otro lado, determinadas variables ambientales y biológicas, como la temperatura y la presencia del ciliado del cual *Dinophysis* se alimenta y obtiene sus plástidos (*Mesodinium rubrum*) pueden relacionarse directamente con la producción de toxinas (Kamiyama et al., 2010), incluso afectar de manera diferente la producción de PTX y de AO. Kamiyama et al. (2010) han observado que el contenido celular promedio de PTX-2 durante la fase exponencial de crecimiento fue mayor a temperaturas más bajas, y detectaron también un aumento rápido en OA y DTX-1 dentro de las células de *D. acuminata* después del consumo de *Mesodinium rubrum*, sugiriendo una asociación con los plástidos originarios de la presa.

A diferencia del predominio de PTX observado durante esta tesis en muestras de fitoplancton, en un estudio reciente acerca de la ocurrencia de toxinas lipofílicas en bivalvos colectados a lo largo de la costa argentina, se detectaron OA/DTX en 43 muestras mientras que PTX se encontraron únicamente en 8 de las 69 muestras analizadas (Turner & Goya, 2015). Los autores remarcaron la baja concentración de PTX y la ausencia de AO en muestras con presencia de PTX. Asimismo, DTX-1, AO y sus acyl-derivados fueron detectados en moluscos colectados durante un episodio de intoxicación por TDM en la Provincia de Buenos Aires durante un evento tóxico (Sar et al., 2012). De todas maneras, la concentración de toxinas en bivalvos y en plancton suelen diferir marcadamente (Pavela-Vrančić et al., 2001; Moroño et al., 2003; Blanco et al., 2007; Alves-de-Souza et al., 2014). Un factor que puede contribuir a la determinación de diferentes perfiles y concentraciones de toxinas entre el plancton y los organismos filtradores es la proporción de toxina que permanece dentro de las células de los organismos productores con respecto a la que es excretada hacia el agua de mar. En el caso de las PTX respecto del AO, las primeras tienen una mayor tendencia a permanecer dentro de las células o adosadas al material orgánico luego de que el bloom del organismo productor haya cesado (Nagai et al., 2011; Smith et al., 2012), lo cual podría causar una mayor proporción de PTX en plancton respecto de los organismos

filtradores como son los bivalvos. Considerando lo antes mencionado, la escasez de OA y derivados y la dominancia de PTXs en los perfiles hallados podría indicar una tendencia de las poblaciones de *Dinophysis* del Mar Argentino a producir mayormente PTX, ya sea por características genéticas relacionadas con la regulación metabólica de la producción de toxinas o con factores ambientales, como por ejemplo la concentración de nutrientes (Hattenrath-Lehmann & Gobler, 2015), la salinidad (Guerrin et al., 2007) y la temperatura (Kamiyama et al., 2010); así como también ser una consecuencia de la tendencia de las PTX a permanecer dentro de las células. Si bien el establecimiento de cultivos del género es complicado debido a sus requerimientos tróficos, el análisis de células cultivadas o aisladas de manera individual a partir de muestras de campo es imprescindible para completar el conocimiento sobre la producción y perfiles tóxicos de *Dinophysis* en el Mar Argentino.

Capítulo 5: Especies de Alexandrium y toxinas asociadas



5.1 Introducción

El género *Alexandrium* Halim pertenece al orden *Gonyaulacales*. Los miembros de este orden se caracterizan por poseer una forma más o menos esférica con un cíngulum ubicado en la región ecuatorial de la teca, excavado y notoriamente desplazado. El sulcus define la región ventral, comienza en el centro de la teca y se extiende hasta el extremo antapical. El género *Alexandrium* cumple con las características del orden, aunque presenta un desplazamiento cingular menos evidente (un ancho cingular) que el de otros géneros del orden como por ejemplo *Gonyaulax*; además se caracteriza por presentar la siguiente fórmula tabular: Po, 4' (3'+1'), 6'', 5''', 2''', 6c, 9-10S (Fig. 5.1) y es, desde el punto de vista morfológico, un género muy homogéneo. Las especies que lo componen carecen generalmente de rasgos diagnósticos conspicuos presentes en otros géneros del orden, como la presencia de espinas o un contorno celular característico, por lo cual para su identificación es imprescindible un análisis detallado del tamaño y forma de determinadas placas, principalmente la Po, la primera apical (1'), la sexta precingular (6''), la sulcal posterior (Sp) y anterior (Sa), y la presencia o ausencia del poro ventral (pv) (Balech, 1995).

De acuerdo a la conexión o desconexión entre las placas 1' y Po Balech (1995) dividió al género *Alexandrium* en dos subgéneros, *Gessnerium* (placas 1' y Po desconectadas) y *Alexandrium* (placas 1' y Po conectadas); y dentro de éste último estableció tres complejos bien definidos formados por especies muy similares entre sí: el complejo *A. tamarense*, el complejo *A. minutum* y el complejo *A. ostenfeldii*. El advenimiento de técnicas moleculares permitió revisar la clasificación morfológica de las especies y subgéneros de *Alexandrium*. Análisis filogenéticos permitieron identificar varios clados bien soportados dentro del género, pero las filogenias obtenidas no apoyaron la separación en los dos subgéneros propuesta previamente, ya que dichos grupos no resultaron ser monofiléticos (Penna et al., 2008; Anderson et al., 2012a). Por otro lado, se comprobó la existencia de tres complejos de especies bien definidos como resultado de un análisis de máxima similitud inferido a partir de ARN de la subunidad ribosómica mayor. Estos coincidieron con los grupos morfológicos del subgénero *Alexandrium* propuestos por Balech: el grupo *A. ostenfeldii*; el grupo *A. minutum*, y el grupo *A. tamarense* (Anderson et al., 2012a).

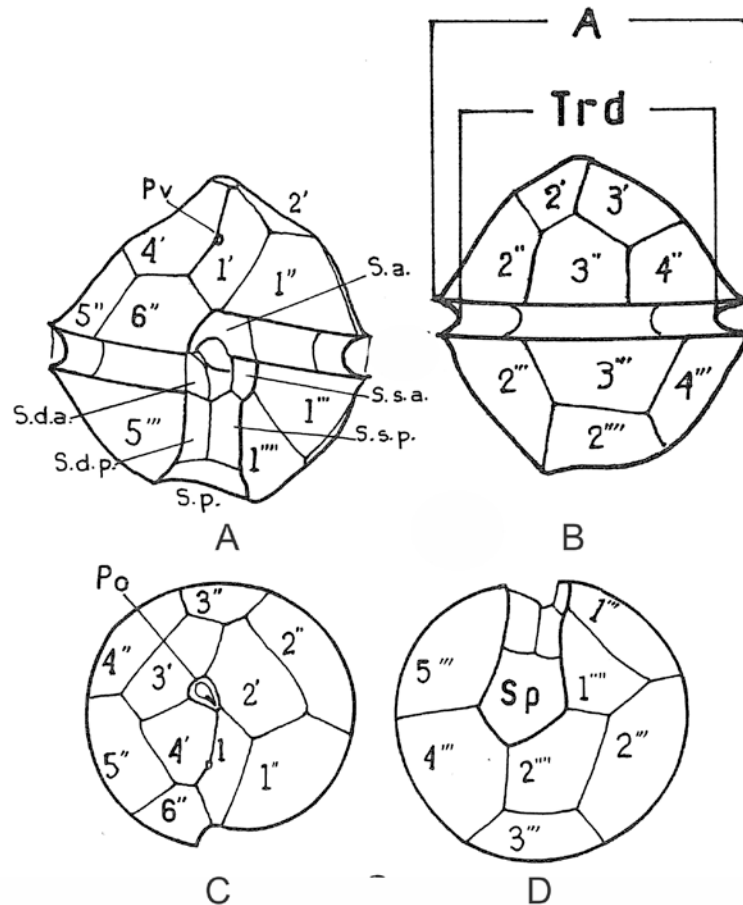


Fig. 5.1: Esquema del patrón de placas del género *Alexandrium*. A) vista ventral B) vista dorsal. C) vista apical. D) vista antapical. Abreviaciones: S.a.: sulcal anterior. S.d.a.: sulcal anterior derecha. S.s.a.: sulcal anterior izquierda. S.s.p.: sulcal posterior izquierda. S.d.p.: sulcal posterior derecha. S.p.: sulcal posterior Pv: poro ventral. A: amplitud. Trd: transdiámetro. Po: complejo del poro apical (tomado de Balech, 1995).

Particularmente dentro del complejo de especies *A. tamarense*, las filogenias construidas a partir de grandes bases de datos con secuencias de operones ribosomales arrojaron árboles con cinco ribotipos bien definidos, con distancias genéticas entre sí tan grandes como las existentes entre otras especies del género (Wang et al., 2014). Un análisis detallado de los caracteres morfológicos propuestos para su identificación taxonómica (ej. presencia/ausencia del poro ventral, formación de cadenas, poros de conexión en Po y sp, etc.) demostró que la mayoría de los caracteres se comparten entre los cinco tipos ribosomales, de manera que no resultan adecuados para la diferenciación de especies dentro del complejo (John et al., 2003, 2014; Lilly et al., 2007; Anderson et al., 2012a). Recientemente, los cinco ribotipos han sido propuestos como especies diferentes en base a la gran distancia genética entre ellos (Lily et al., 2007; Anderson et

al., 2012a; John et al., 2014; Wang et al., 2014) y se han propuesto nombres específicos para los mismos (John et al., 2014). En particular, la nomenclatura del ribotipo I generó un debate respecto de cómo nombrar a sus miembros (Fraga et al. 2015) y finalmente *A. catenella* se estableció como válido por el Comité Nomenclatural de Algas basado en la prioridad por antigüedad (Prud'homme van Reine et al., 2017).

La relación entre especies del complejo *A. minutum* también se revisó aplicando estudios genéticos y análisis morfológicos detallados (Lilly et al., 2005). Las cepas antes designadas como *A. lusitanicum* o *A. angustitabulatum* se re-designaron como *A. minutum*; mientras que *A. tamutum*, *A. insuetum* y *A. andersonii* formaron clados bien definidos y presentaron una verdadera diferenciación genética respecto de cepas de *A. minutum* (Franco et al., 1994; Lilly et al., 2005). Sin embargo, *A. andersonii* no quedó agrupado dentro del complejo de especies de *A. minutum* sino que presentó mayor cercanía filogenética con *A. ostenfeldii* (Lilly et al., 2005).

Análisis filogenéticos de secuencias de ADN ribosómico proveniente de cultivos de *A. ostenfeldii* y *A. peruvianum* establecidos a partir de distintas regiones de Europa y América del Norte, Perú, China, Japón y Nueva Zelanda, revelaron una estructura genética compleja formada por seis grupos muy cercanos entre sí. Los caracteres diagnósticos utilizados antiguamente para la diferenciación entre ambas especies resultaron ser menos estables de lo que se había asumido, presentando una gran variación dentro y entre cepas (Kremp et al., 2013). Como resultado de esta inconsistencia en la diferenciación morfológica de las dos especies y la similitud genética entre cepas de una u otra especie, se consideraron a los seis grupos del complejo como pertenecientes a una única especie, la cual por orden de prioridad corresponde denominar *A. ostenfeldii* (Kremp et al., 2013).

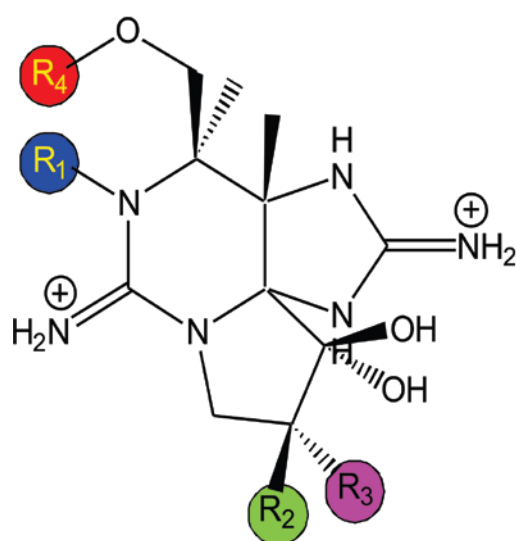
El género *Alexandrium* es uno de los más importantes dentro de los dinoflagelados toxígenos a nivel mundial por ser el agente causante de FANs con mortalidad de vertebrados (incluido el hombre), como consecuencia del Síndrome Paralizante de Moluscos (SPM). En la actualidad comprende alrededor de 13 especies reconocidas como potenciales productoras de toxinas, de las cuales la mayoría presenta una distribución cosmopolita (Anderson et al., 2012a). Los representantes toxígenos del género *Alexandrium* son capaces de generar una gran variedad de toxinas. Entre las más relevantes en cuanto a los impactos en la salud humana se encuentran las toxinas paralizantes de moluscos (TPM), las cuales comprenden varios tipos de toxinas hidrofílicas. Las más significativas son la saxitoxina (STX) y sus derivados, entre otras

las gonyautoxinas (GTX), causantes del SPM, el cual ha generado muertes humanas y pérdidas millonarias en acuicultura. Las TPM son tetrahidropurinas (Fig. 5.2) con alto poder neurotóxico, las cuales pueden acumularse en moluscos y transferirse a niveles superiores de la cadena trófica. En los vertebrados, estas toxinas provocan la inhibición de los canales de sodio, afectando el potencial de acción de las células musculares y de las neuronas, lo cual limita o anula la contracción muscular (Catterall et al., 1979; Manger et al., 1993; Luckas et al., 2003; Cusick & Sayler, 2013). En casos severos, los síntomas del SPM en humanos incluyen parálisis muscular, gran dificultad para respirar, sensación de ahogo y muerte por parálisis respiratoria. No obstante, los pacientes tratados a tiempo con respiración asistida sobreviven sin presentar síntomas crónicos (Hallegraeff, 1993). Finalmente, las toxinas N-sulfocarbamohilizadas (B/C) son las representantes menos tóxicas dentro de las TPM (Wiese et al., 2010).

Otro grupo de toxinas producidas por el género *Alexandrium*, pero relacionadas hasta el momento únicamente con la especie *A. ostenfeldii*, son los espirólidos (SPX), caracterizados como toxinas lipofílicas del grupo de las iminas cíclicas neurotóxicas (Cembella et al., 2001; Franco et al., 2006) (Fig. 5.3). Hasta el presente no existen casos documentados de intoxicación humana por SPX, aunque se sabe que actúan como antagonistas del receptor muscarínico de acetilcolina (Wandscheer et al., 2010) y son activadores de canales de calcio tipo L (Hu et al., 1995). Asimismo, se han observado síntomas neurotóxicos al administrar la toxina intraperitonealmente a roedores de laboratorio (Guéret & Brimble, 2010). Recientemente, otro grupo de iminas cíclicas denominadas gymnodiminas (GYM), han sido detectadas en *A. ostenfeldii*. Hasta el momento los registros de cepas de *A. ostenfeldii* productoras de GYM provienen de estuarios costeros de EEUU (Van Wagoner et al., 2011; Borkman et al., 2012), de una floración en Holanda (Van de Waal et al., 2015) y de cultivos del mar Báltico (Salgado et al., 2015; Harju et al., 2016). Estudios toxicológicos detectaron que la GYM A (Fig. 5.4) presenta los mismos efectos que los SPX luego de ser inyectada intraperitonealmente en ratones de laboratorio (Munday et al., 2004; Kharrat et al., 2008).

Finalmente, un tercer grupo de toxinas producidas por *A. monilatum*, *A. pseudogonyaulax* y *A. hiranoi* son las goniominas (Fig. 5.5) (Murakami, 1998; Hsia, 2005), las cuales actualmente no se consideran un riesgo para la salud humana, aunque han causado parálisis y mortandad de peces en las costas de Texas, Estados Unidos (Gates & Wilson, 1960).

Además de la producción de toxinas, la producción extracelular de metabolitos secundarios es común dentro del género *Alexandrium* y ha sido verificada para una gran cantidad de especies (Tillmann & John, 2002; Tillmann et al., 2008, 2016a). Estos compuestos tienen la capacidad de provocar daños a distintos organismos de la comunidad planctónica, como otras microalgas, protistas heterótrofos, bacterias y crustáceos (Matsuoka et al., 2000; Lush et al., 2001; Tillmann & Hansen, 2009; Weissbach et al., 2011).



Toxina	R1	R2	R3	R4
STX	H	H	H	CO-NH ₂ (Carbamoyl-)
NEO	OH	H	H	
GTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻	
GTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	
GTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	
GTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H	CO-NH-SO ₃ ⁻ (N-Sulfocarbamoyl-)
B1= GTX5	H	H	H	
B2= GTX6	OH	H	H	
C3	OH	H	OSO ₃ ⁻	
C1	H	H	OSO ₃ ⁻	
C2	H	OSO ₃ ⁻	H	H (Decarbamoyl-)
C4	OH	OSO ₃ ⁻	H	
dc-STX	H	H	H	
dc-NEO	OH	H	H	
dc-GTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻	
dc-GTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	
dc-GTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	
dc-GTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H	

Fig. 5.2: Estructura química de saxitoxina (STX) y sus derivados, según los grupos químicos de los radicales R1, R2, R3 y R4

Particularmente en el Atlántico Sudoccidental se ha documentado la presencia de varias especies del género *Alexandrium* y numerosos eventos de SPM. En aguas costeras del sur de Brasil, la primera floración de representantes del complejo *A. tamarense* se registró en 1996 (Odebrecht et al., 1997); recientemente se han establecidos cultivos del mismo sitio, los cuales resultaron pertenecer al ribotipo I del complejo *A. tamarense* (Persich et al., 2006). Asimismo, se registró una floración tóxica cerca de la ciudad de Río de Janeiro (Menezes et al., 2007), cuya especie causante se identificó en ese momento como *A. minutum*, pero análisis posteriores ubicaron a los

ejemplares dentro de una nueva especie, para la cual se ha propuesto el nombre de *A. fragae* (Branco et al., 2016). *A. fraterculus* se reportó al sur de Brasil (Balech, 1995; Proença et al., 2002), formando una floración no tóxica en el estado de Santa Catarina (Omachi et al., 2007). *A. tamiyavanichi* es otro de los representantes toxígenos del género en Brasil y estudios realizados con cultivos mostraron que presenta un perfil de toxinas dominado por STX (Menezes et al., 2010). A lo largo de la costa uruguaya la presencia de representantes del complejo *A. tamarense* es frecuente desde el año 1980 (Davison & Yentsch 1985; Rodriguez et al., 1997; Méndez et al., 2000). Además, una floración de la especie *A. fraterculus*, mundialmente considerada como no tóxica, ha sido asociada con eventos de SPM (Méndez, 1993).

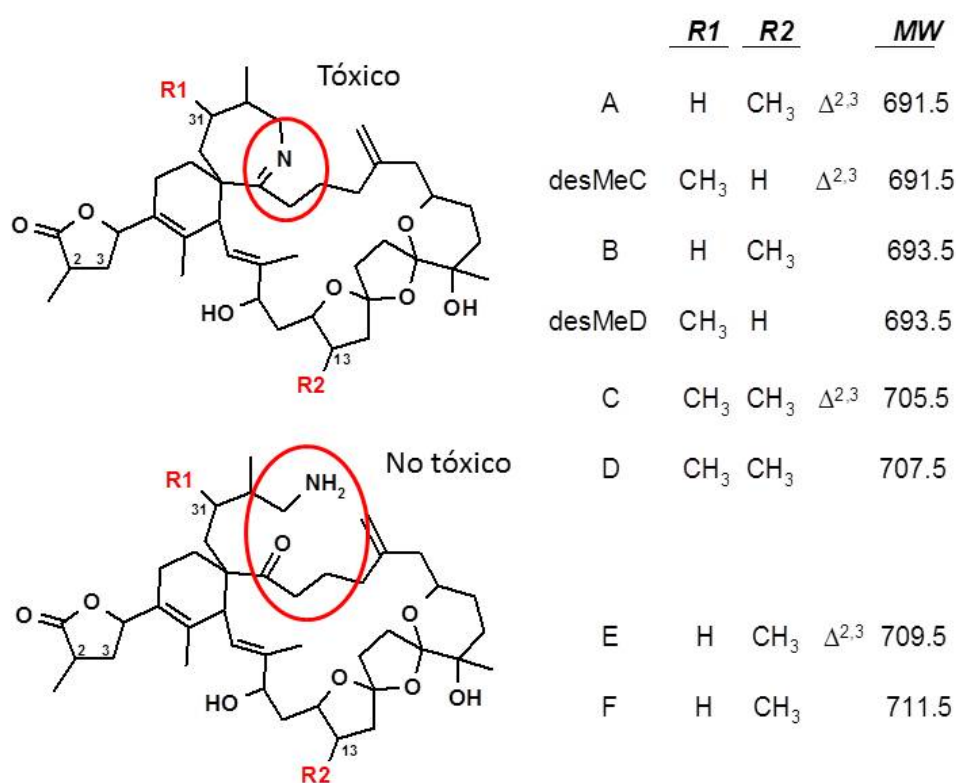


Fig. 5.3: Estructura química de distintos análogos de espirólidos (SPX) según los grupos químicos de los radicales R1 y R2.

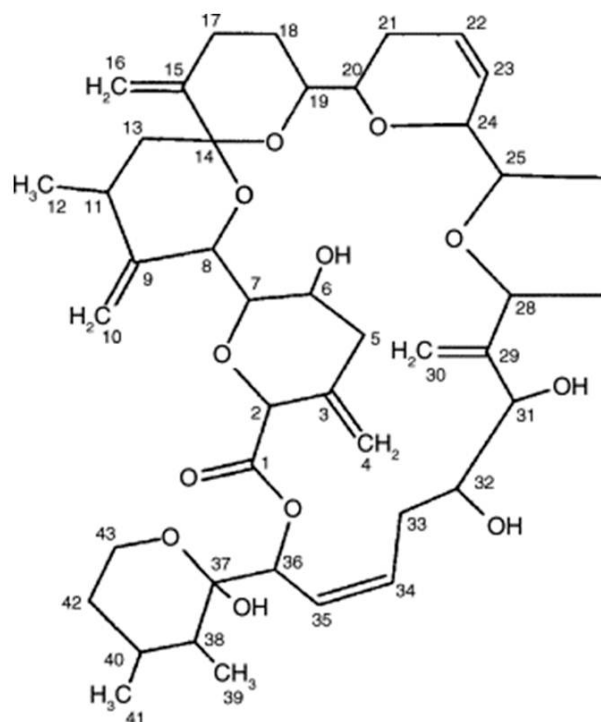


Fig. 5.4: Estructura química de la gymnodimina A (GYM).

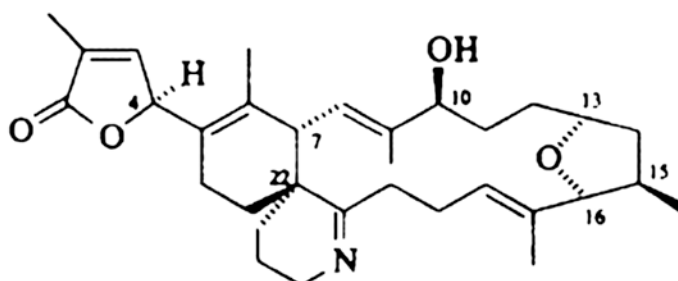


Fig. 5.5: Estructura química de la goniodimina A.

En el Mar Argentino, existen numerosos antecedentes de floraciones de la especie toxígena *A. tamarense sensu* Balech (1995) desde 1980, principalmente durante primavera (Carreto et al., 1981; Esteves et al., 1992; Carreto et al., 2002; Gayoso et al., 2006), llegando a provocar en algunos casos mortandad de aves y mamíferos marinos e

incluso la muerte de personas (Elbusto et al., 1981; Vecchio et al., 1986; Montoya et al., 1996, 1998; Montoya & Carreto, 2007). Dentro de las especies del género *Alexandrium* registradas para el Mar Argentino (*A. catenella*, *A. fraterculus*, *A. kutnerae*, *A. tamarense* y *A. tropicale*) las únicas toxígenas corresponden al complejo *A. tamarense*. (Balech, 1995). Hasta el momento se poseen datos moleculares de tres cepas del género *Alexandrium* aisladas del Mar Argentino, todas correspondientes al complejo *A. tamarense*: la cepa MDQ1096 aislada frente a la ciudad de Mar del Plata, la cual resultó pertenecer al ribotipo I (Penna et al., 2008); la cepa Kci aislada cerca de Islas Malvinas, correspondiente al ribotipo IV (Ho et al., 2003, 2012); y la cepa IS008, perteneciente al ribotipo I (Inés Sunesen, comunicación personal). Otros estudios genéticos han demostrado que las poblaciones chilenas de representantes del complejo *A. tamarense* poseen iguales secuencias de los genes D1–D2 (de la unidad ribosomal mayor) que la cepa argentina MDQ1096 (Lilly et al., 2007; Aguilera-Belmonte et al., 2011).

En cuanto a la toxínología del género *Alexandrium* en el Mar Argentino, análisis de la cepa MDQ1096 mostraron un perfil dominado por C1/2 y en menor medida GTX1/4 (Carreto et al., 2001). Un patrón similar, con dominancia de C1/2, se detectó en la cepa Kci (Ho et al., 2003) y también en cepas provenientes de distintas zonas costeras y de aguas abiertas, las cuales se caracterizaron por generar grandes cantidades de C1/2, a excepción de una cepa más tóxica proveniente de Península Valdés que presentó un perfil dominado por GTX1/4 (Montoya et al., 2010). En este sentido, se encontró que las poblaciones naturales resultaron ser más tóxicas que las cepas en cultivo a causa de la mayor cantidad relativa de GTX (Montoya et al., 2010). Esto concuerda con estudios realizados con muestras de campo del Golfo San Jorge, las cuales también presentaron un perfil dominado por GTX, principalmente 1/4 (Andrinolo et al., 1999). Por otro lado, el productor de espirólidos *Alexandrium ostenfeldii* es comúnmente observado durante la primavera en el Canal de Beagle (Tierra del Fuego). Análisis de toxicidad a partir de cultivos celulares detectaron la presencia de 13-desmetil espirólido (13-desMe-C = SPX1), 20-methyl espirólido G (20-Me-G) y un tercer componente que no coincidió en su estructura molecular con ningún espirólido descrito anteriormente (Almandoz et al., 2014). Asimismo, se han detectado concentraciones moderadas ($> 16 \mu\text{g/kg}$) de SPX1 en los moluscos *Aulacomya ater* y *Mytilus edulis* provenientes de Bahía Brown (Tierra del Fuego), y concentraciones bajas (menores al límite de cuantificación) en bivalvos provenientes de las costas de Santa Cruz, Chubut, Rio Negro y Buenos Aires (Turner & Goya; 2015).

A pesar de la importancia del género *Alexandrium* como productor de eventos tóxicos en el Mar Argentino, que ocasionan con frecuencia vedas para la recolección de moluscos y ocasionalmente casos severos de intoxicación humana por TPM, no existen hasta el momento trabajos holísticos que aborden su variabilidad morfológica, genética y toxinológica. En el presente capítulo se analiza la diversidad, distribución y abundancia del género *Alexandrium* por medio de estudios morfológicos y moleculares, en conjunto con la detección y cuantificación de toxinas relacionadas.

5.2 Descripción morfológica de las especies encontradas

Alexandrium tamarense (complejo de especies) (Fig. 5.6)

Balech (1995): 38-50 Láms. VI a XI.

La mayoría de las células de forma levemente aplanada respecto del eje longitudinal, más anchas que largas (Fig. 5.6A), aunque algunas de mayor largo respecto del ancho, con una epiteca mayor a la hipoteca y una forma más o menos oval en vista ventral (Fig. 5.6 B). El cingulum es excavado y descendiente, con aletas de desarrollo moderado (Fig. 5.6 C). La placa Po posee forma de coma y un poro apical mayor con poros marginales más pequeños. Unas pocas células presentaron un poro de conexión en la placa Po (Fig. 5.6 C). La placa 1' posee el margen derecho cóncavo en la región anterior bordeando la 4'' (Fig. 5.6 D) o de forma casi rectangular con márgenes rectos (Fig. 5.6 F). Algunas células presentan un pequeño puente en el margen posterior de la 1' (Fig. 5.6 G). Presencia de un poro ventral localizado en la sutura entre las placas 1' y 4' (Fig. 5.6 H) o en el margen derecho de la 1' (Fig. 5.6 I), aunque excepcionalmente también sobre la 4' (Fig. 5.6 J). El tamaño del poro ventral es variable respecto de 1', aunque siempre circular (Fig. 5.6 K-M). La placa 6'' es siempre más ancha que alta (Fig. 5.6 K, L, N) y la Sp ~1.6 veces más larga que ancha ($n = 15$) y sin poro de conexión (Fig. 5.6 Ñ, O), aunque unos pocos especímenes presentaron una placa Sp de forma casi isodiamétrica y con poro de conexión (Fig. 5.4 P-R).

Dimensiones: largo 25–37 μm , ancho: 25–38 μm ($n = 30$).

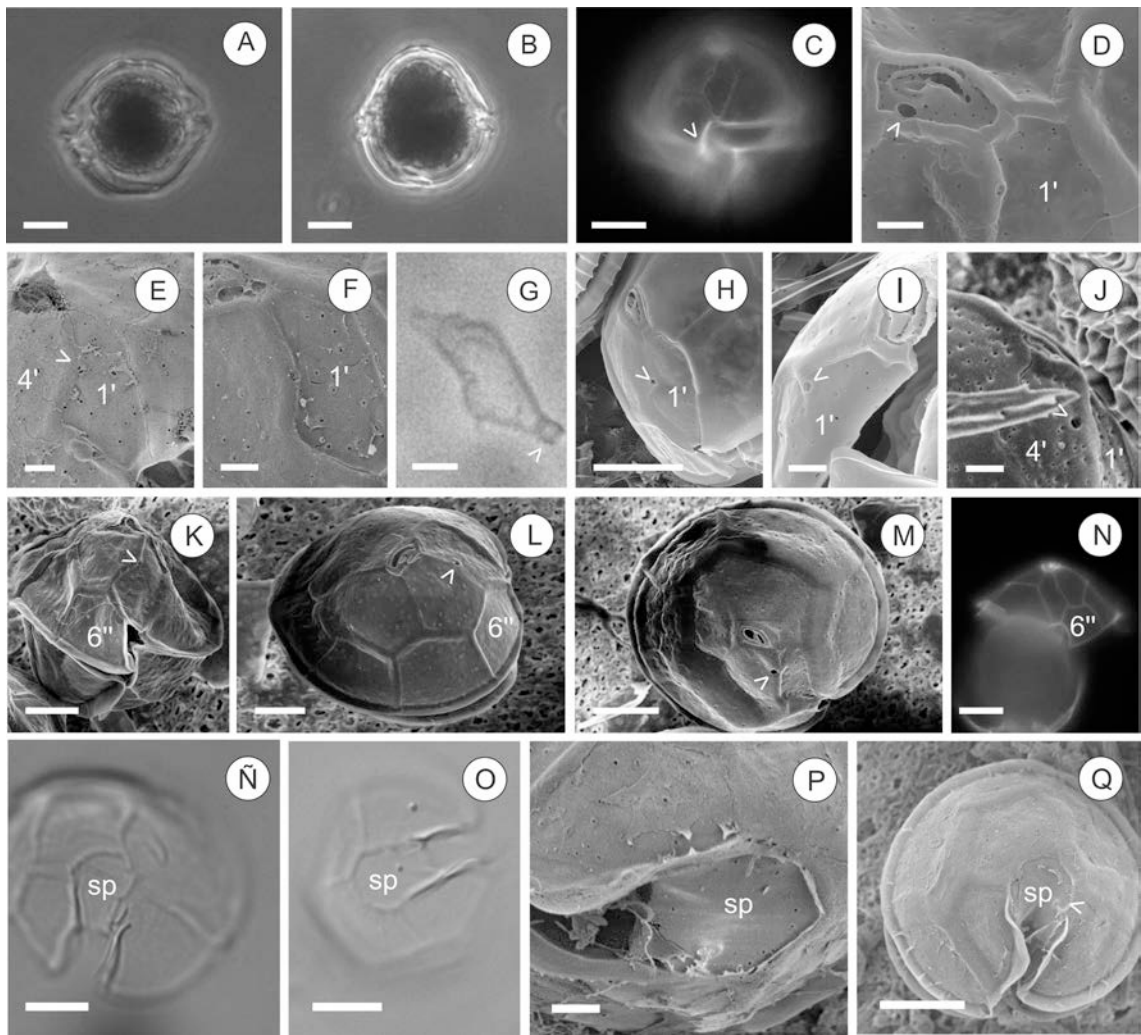


Fig. 5.6: Fotografías de representantes del complejo *A. tamarense* tomadas con microscopía óptica (A, B, G, Ñ, O), óptica de fluorescencia (C, N) y electrónica de barrido (D-F, H-M, P, Q). A-C) Aspecto general en vista ventral, note el desplazamiento del cíngulum en C (flecha). D) Detalle de la región apical, note la presencia de un poro de conexión en Po (flecha). E-G) Tres placas 1', note la concavidad del margen derecho de la placa en E y la presencia de un puente en la región posterior en G (flecha). H-J) Detalles de la 1', note la posición del poro apical, entre 1' y 4' en H, en 1' en I y en 4' en J (flechas). K-M) Vista ventral (K), dorso-apical (I) y apical (M) donde se observan los diferentes tamaños relativos del poro ventral, note las dimensiones de la placa 6'', más ancha que alta. N) Vista interna ventral de la epitoca, note las dimensiones de la placa 6''. N) Vista ventral de la epitoca. Ñ-Q) Vistas antapicales, note que la placa Sp es alargada en Ñ y O y no posee poro de conexión, mientras que en P y Q es casi isodiamétrica y se observa la presencia del poro de conexión. Escala: A-C, H, K-O, Q, R= 10 μ m. D-G, I, J, P= 2 μ m.

Alexandrium* aff. *minutum Halim

(Fig. 5.7)

Balech (1995): 24-26 Lám. I.

Sinónimos: *Pyrodinium minutum* (Halim) Taylor; *Alexandrium ibericum* Balech; *Alexandrium lusitanicum* Balech; *Alexandrium angustitabulatum* Taylor.

Contorno celular de forma oval (Fig. 5.7). Placa Po con forma de coma, sin poro de conexión (Fig. 5.7 B, C). Placa 1' de forma elongada con un poro ventral en el margen derecho ubicado hacia la mitad de la placa (Fig. 5.7 B) o en la región posterior (Fig. 5.7 C). Presencia de una prolongación muy fina de la placa 1' contactando con Po (Fig. 5.7 D). Placa 6'' angosta, ~1.2 a 1.75 veces más larga que ancha ($n = 18$) (Fig. 5.7 E, F). Sp corta, ~1.5 veces más ancha que larga ($n = 12$) (Fig. 5.7 G, H).

Dimensiones: largo 23 a 35 μm , ancho 20 a 33 μm ($n = 15$).

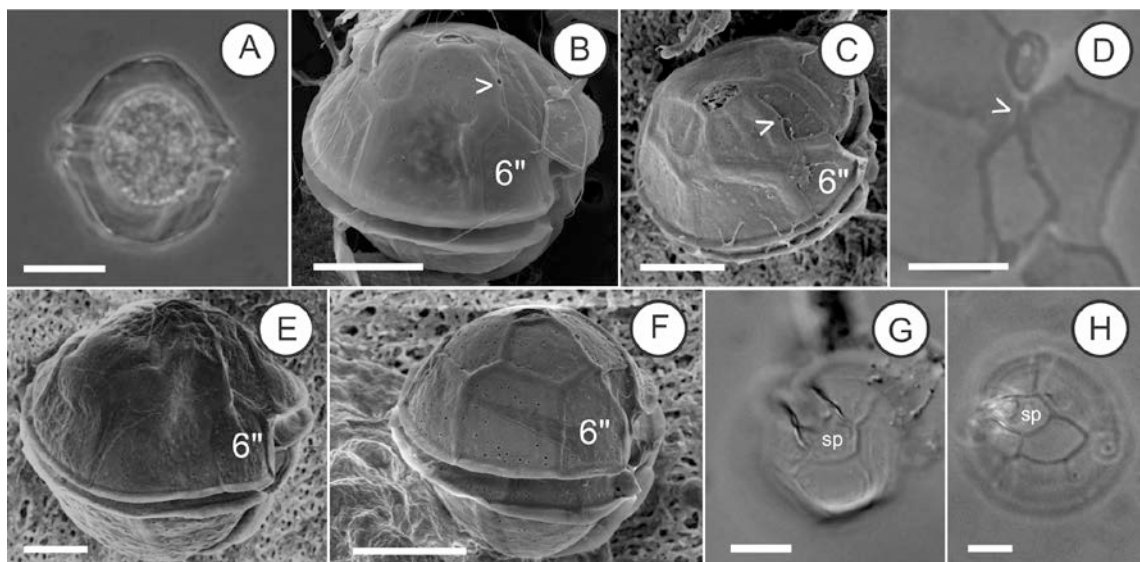


Fig. 5.7: Fotografías de *A. minutum* tomadas con microscopía óptica (A, D, G, H) y electrónica de barrido (B, C, E, F). A) Aspecto general en vista ventral. B) Vista ventro-apical, note la ubicación del poro ventral en la región central de la placa 1' (flecha). C) Vista apical, note la ubicación del poro ventral en la mitad posterior de la placa 1' (flecha). D) Detalle de placa 1', note la presencia de una prolongación apical muy fina de 1' contactando con Po. E-F) Vista lateral-derecha, note las dimensiones de la placa 6'', más alta que ancha. G-H) Vista antapical, note las dimensiones de la Sp, más ancha que larga. Escala= 10 μm .

Alexandrium ostensfeldii (Paulsen) Balech and Tangen

(Fig. 5.8)

Balech (1995): 30-33 (*A. ostensfeldii*-*A. peruvianum*) Láms. III y IV.

Sinónimos: *Goniodoma ostensfeldii* Paulsen; *Gonyaulax ostensfeldii* (Paulsen) Paulsen; *Gonyaulux ostensfeldii* (Paulsen) Paulsen; *Heteraulacus ostensfeldii* (Paulsen) Loeblich; *Gessnerium ostensfeldii* (Paulsen) Loeblich & Loeblich; *Triadinium ostensfeldii* (Paulsen) Dodge.

Contorno celular globoso con márgenes redondeados (Fig. 5.8 A). Placa 1' elongada con márgenes rectos y un poro ventral grande de forma arriñonada (Fig. 5.8 B, C). Placa Sa de similar largo que ancho con forma de letra A.

Dimensiones: largo 30 a 45 μm , ancho: 25 a 45 μm ($n = 20$).

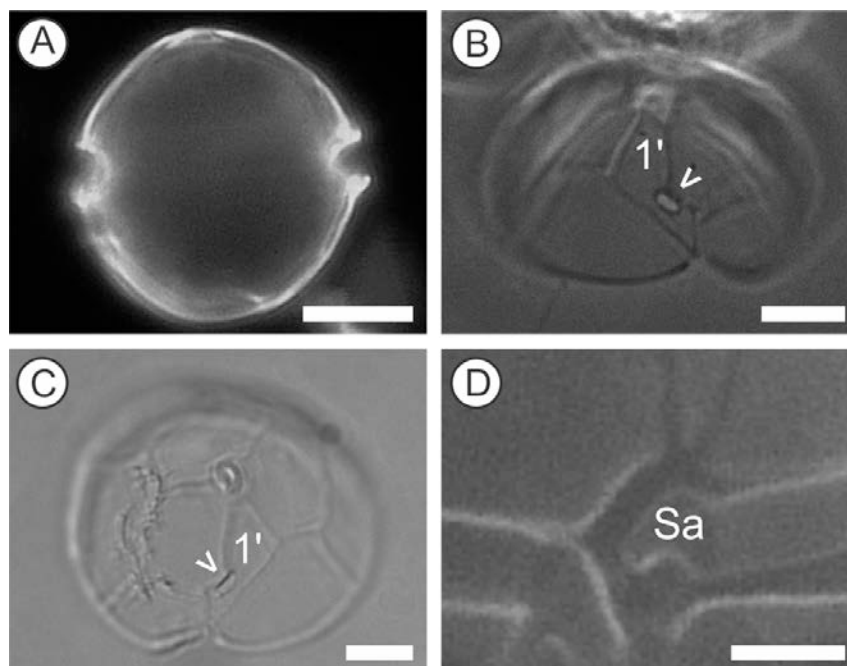


Fig. 5.8: Fotografías de *A. ostenfeldii* tomadas con microscopía óptica (A- D). A) Contorno general en vista ventral. B, C) Vistas ventral interior B) y apical C) de la epiteca, note el gran tamaño del poro ventral y la forma de la placa 1', presentando un margen derecho formado por dos segmentos rectos a cada lado del poro. D) Detalle de la región sulcal, note la forma de letra A de la placa Sa. Escala: A-C= 10 μm .

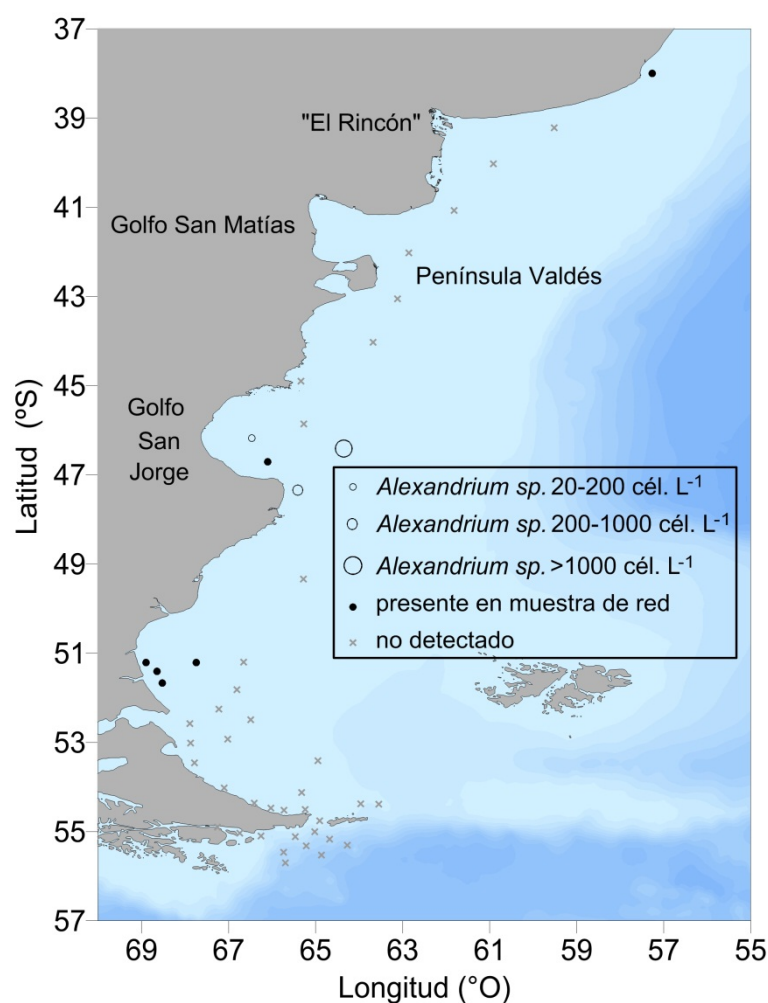
5.3 Distribución y abundancia del género *Alexandrium* y toxinas asociadas

5.3.1 Campaña de otoño (C1)

Distribución y abundancia

El género *Alexandrium* se observó en el 7 % de las muestras de botella, correspondientes al Golfo San Jorge y alrededores (Fig. 5.9), con densidades celulares de 200, 640 y 1.240 cél. L^{-1} que representaron entre el 3,5 y 11 % de la abundancia total de los dinoflagelados (promedio = 6 %). Se observó además en muestras de red en seis

estaciones ubicadas en el Golfo San Jorge, en aguas de plataforma frente a la provincia de Buenos Aires, y en Bahía Grande, Santa Cruz (Fig. 5.9).



Todas las células analizadas mediante técnicas de microscopía fueron asignadas al complejo *A. tamarense*. El rango de temperatura en que se encontraron células del complejo *A. tamarense* fue de 10 a 18 °C y la salinidad de 32,7 a 34,2, mientras que su densidad máxima se registró a 12 °C y 33,4.

Fig. 5.9: Distribución y abundancia del género *Alexandrium* en muestras de botella y presencia en muestras de red durante la C1.

Toxinas asociadas

Todas las toxinas detectadas durante la C1 corresponden al grupo de las TPM, las cuales se detectaron en el 45 % de las muestras de red correspondientes a la fracción de 20-50 µm, y en una muestra de la fracción de 50 a 200 µm, en concentraciones entre 4,7 y

5.257 ng LR⁻¹ y de 4 ng respectivamente. Se encontraron tres análogos diferentes de TPM: GTX 2/3, STX y NEO-STX. Las GTX2/3 dominaron el perfil en el 85% de las muestras ($n = 20$), en las cuales representaron entre el 98 y 100 % del total de TPM (Fig. 5.10). Se detectó STX en cinco muestras, en concentraciones de 11 a 40 ng LR⁻¹, dominando el perfil de toxinas en dos de ellas colectadas al sur del área de estudio. El análogo NEO-STX se detectó en una única muestra obtenida en el Golfo San Jorge, en la cual dominó el perfil (Fig. 5.8), alcanzando una concentración de 647 ng LR⁻¹.

Las máximas concentraciones de TPM (entre ~1.000 y 5.000 ng LR⁻¹) se hallaron en el Golfo San Jorge y en aguas abiertas adyacentes, asociadas a la presencia de células del complejo *A. tamarense* (Fig. 5.11). En algunas estaciones se detectaron toxinas y no se encontraron células de *Alexandrium* (E: I1, I2, I3, I4, I9, I15, I22, C39B, I46 e I47), aunque en estas muestras las concentraciones de TPM detectadas fueron bajas (< 180 ng LR⁻¹). Por otro lado en una estación se presentó el caso contrario, con detección de células pero no de TPM (E: I52). De todas maneras se encontró una correlación significativa entre células de *Alexandrium* y concentración de TPM ($r = 0,6$ $p < 0,05$). Las cuotas celulares de TPM estimadas para *Alexandrium* variaron entre 1,2 y 35,5 pg cél.⁻¹ ($n = 5$) con máximos al sur del Golfo San Jorge y en aguas abiertas adyacentes.

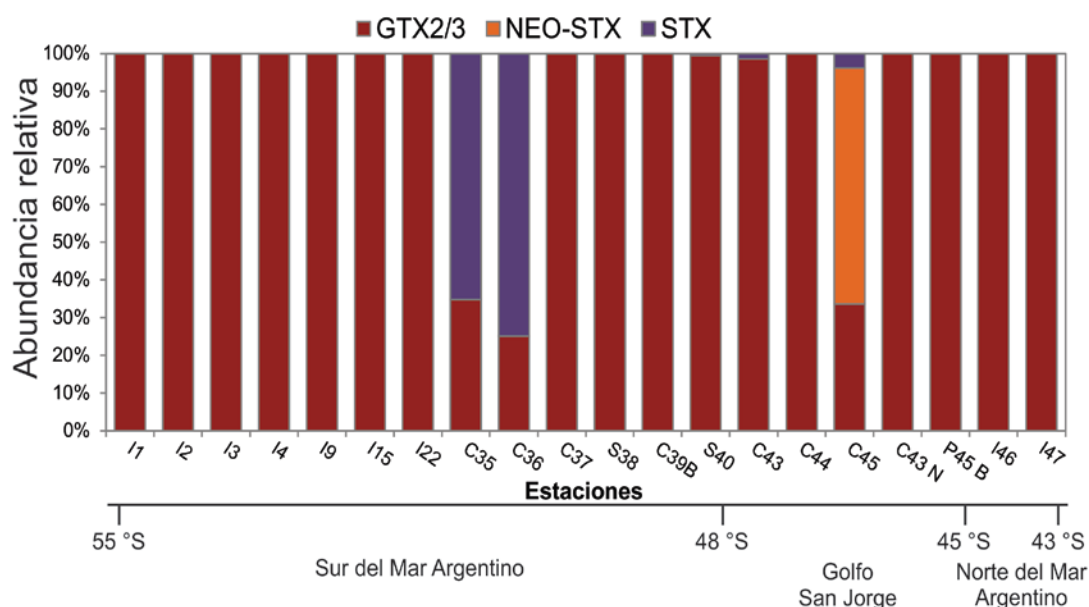


Fig. 5.10: Perfil de toxinas detectado en la fracción de 20-50 μ m de muestras de red a lo largo de la C1.

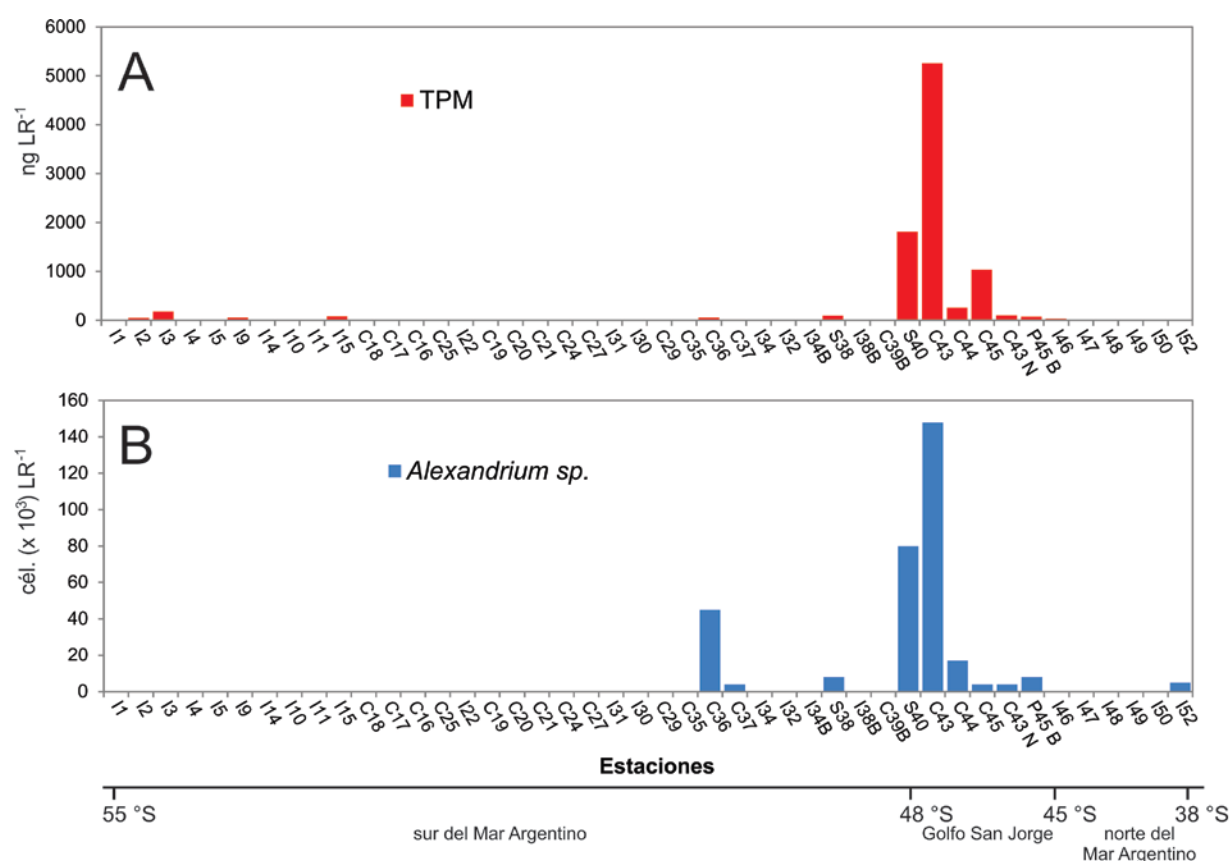


Fig. 5.11: (A) Concentración de toxinas detectadas en la fracción de 20-50 μm de muestras de red y (B) abundancia de células de *Alexandrium* sp. en muestras de red no fraccionadas a lo largo de la C1.

5.3.2 Campaña de verano tardío (C2)

Distribución y abundancia

El género *Alexandrium* se observó en el 30 % de las muestras de botella, correspondientes al Golfo San Matías y al sur de Península de Valdés (Fig. 5.12), con densidades celulares entre 20 y 160 cél. L^{-1} que representaron entre el 0,1 y el 2,5 % de la abundancia total de los dinoflagelados (promedio = 0,5 %). El género *Alexandrium* fue detectado además en muestras de red en otras cinco estaciones en la zona de “El Rincón” y Península de Valdés. Todas las células analizadas mediante técnicas de microscopía fueron asignadas al complejo *A. tamarense*, las cuales se detectaron en un rango de temperatura entre 14 y 18 °C y a una salinidad de 33,2, presentando las máximas densidades celulares a 18 °C.

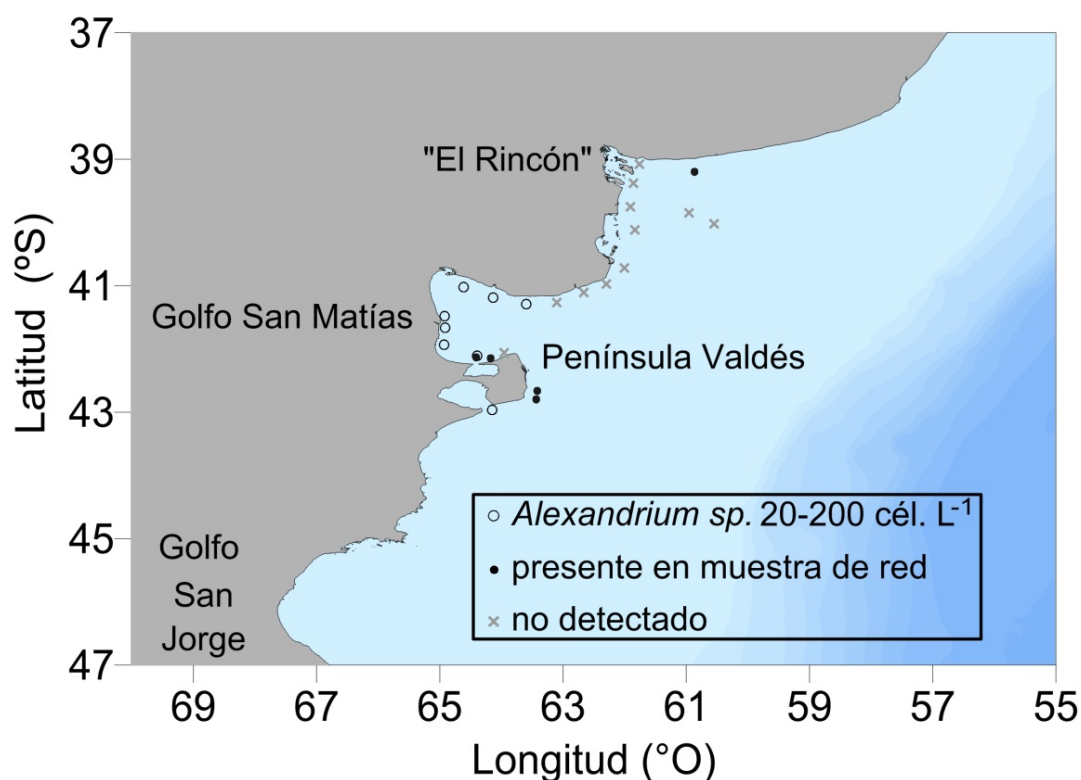


Fig. 5.12: Distribución y abundancia del género *Alexandrium* en muestras de botella y presencia en muestras de red durante la C2.

Toxinas asociadas

Se detectaron toxinas en el 17 % de las muestras de red en las fracciones de 20 a 200 μm , y fueron todas del grupo de las TPM. Las concentraciones totales variaron entre 9,3 y 763,3 ng LR^{-1} . Se encontraron ocho análogos diferentes de TPM: GTX 1/4, GTX 2/3, C1/2, STX y B1. Las mayores concentraciones las alcanzaron los análogos GTX1/4 en la fracción de 50-200 μm , mientras que en la fracción de 20 a 50 μm las concentraciones variaron entre 9,3 y 286,6 ng LR^{-1} , correspondiendo las concentraciones máximas a GTX2/3 y STX. Las GTX2/3 dominaron el perfil en tres de las cuatro estaciones en las cuales se detectaron TPM en la fracción de 20-50 μm , mientras que en una de ellas el perfil estuvo dominado por STX (Fig. 5.13 A). En la fracción de 50-200 μm se detectaron TPM en seis estaciones y presentaron tres perfiles diferentes, dominados por GTX1/4, GTX2/3 y STX (Fig. 5.13 B).

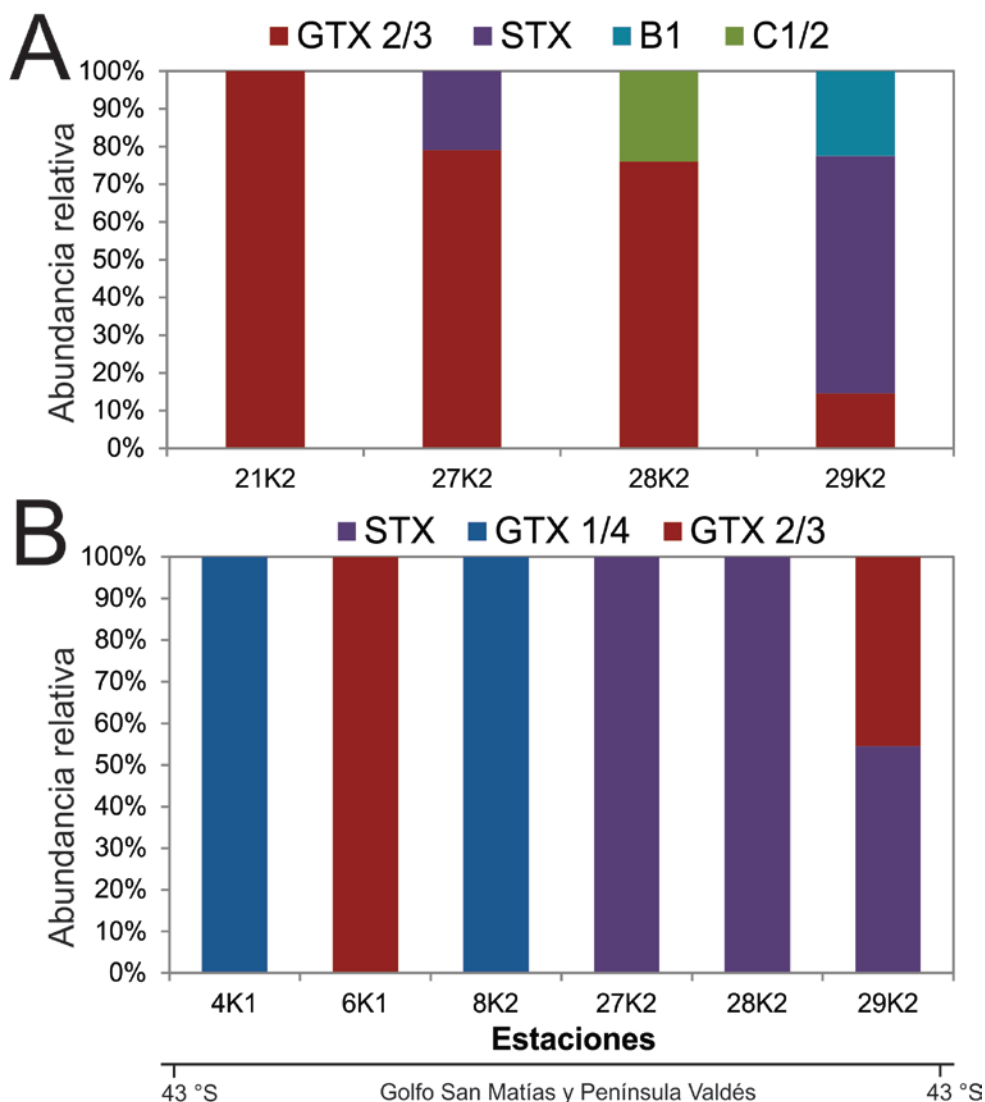


Fig. 5.13: Perfiles de toxinas detectados en la fracción de 20-50 μm (A) y en la fracción de 50-200 μm (B) de muestras de red a lo largo de la C2.

Las máximas concentraciones de TPM se detectaron en el Golfo San Matías y al sur de Península de Valdés. En las cuatro estaciones de la fracción de 20-50 μm en las cuales se encontraron TPM también se hallaron células del complejo *A. tamarense* (Fig. 5.14). La correlación entre células y TPM fue significativa ($r = 0,57$ $p < 0,05$). Las cuotas celulares calculadas variaron entre 0,9 y 5,2 pg TPM cél.^{-1} ($n = 3$), con el valor máximo al sur de la Península de Valdés. Por otro lado, se detectaron bajas densidades (< 40 cél. LR^{-1} , excepto por una estación con 119 cél. LR^{-1}) del complejo *A. tamarense* en otras siete estaciones en las que no se detectaron toxinas en la fracción de 20-50 μm . A su vez en dos estaciones (E 4K1 y 6K1) en la fracción de 50-200 se detectaron

concentraciones de 10 y 532 ng LR⁻¹ de GTX2/3 y GTX1/4 respectivamente pero no se encontraron células del género *Alexandrium*.

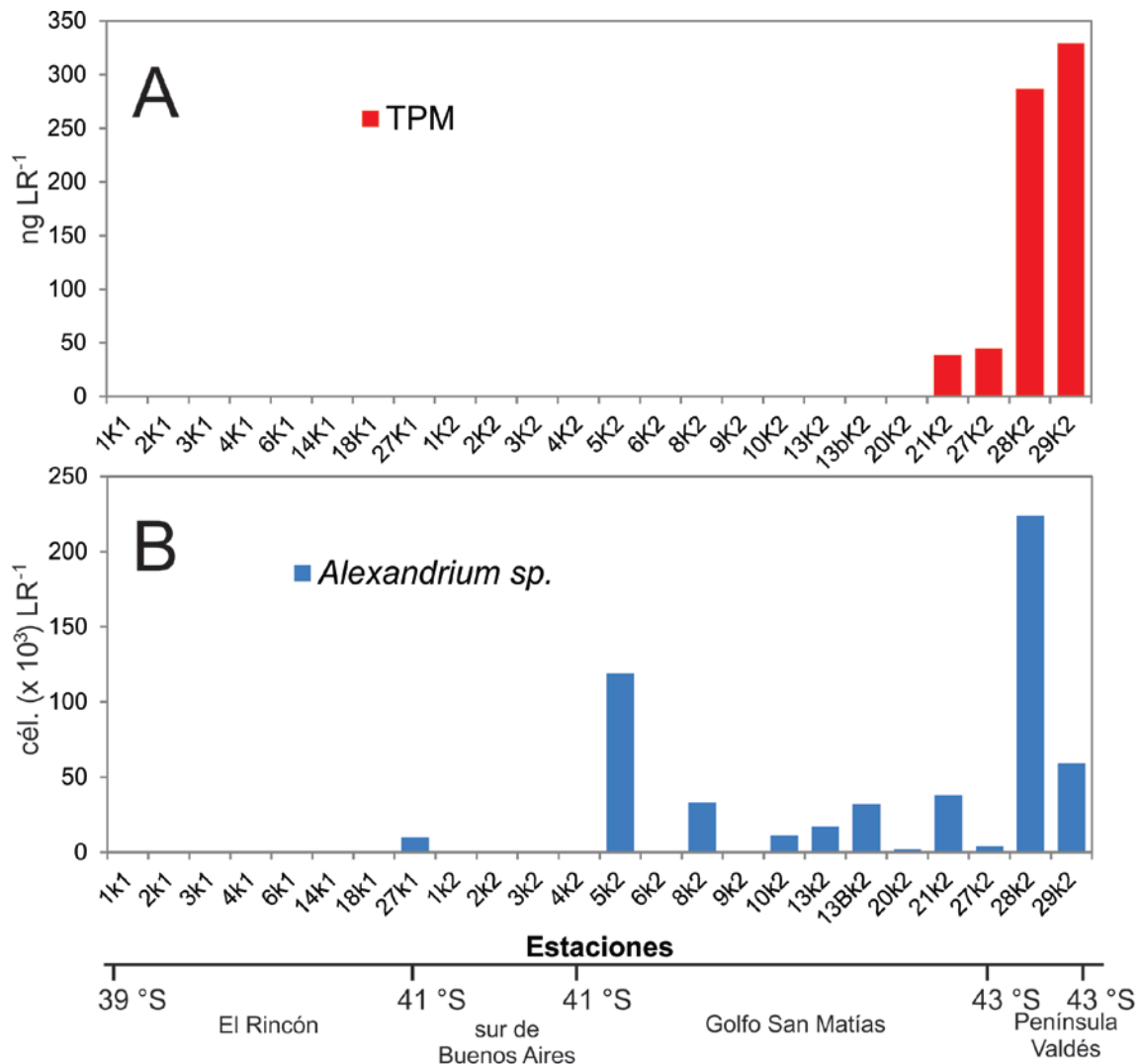


Fig. 5.14: (A) Concentración de toxinas detectadas en la fracción de 20-50 µm de muestras de red y (B) abundancia de células de *Alexandrium* sp. en muestras de red no fraccionadas a lo largo de la C2.

5.3.3 Campaña de primavera (C3)

Distribución y abundancia

El género *Alexandrium* se observó en el 78 % de las muestras de botella, con densidades celulares entre 20 y $2,75 \times 10^4$ cél. L⁻¹, que representaron entre el 0,1 y el 69 % de la abundancia total de los dinoflagelados (promedio = 8 %). Las máximas abundancias se hallaron en el Golfo San Matías ($1,3 \times 10^3$ cél. L⁻¹), en aguas de

plataforma frente a Península Valdés ($1,1 \times 10^3$ cél. L^{-1}), en el Golfo San Jorge ($16,5 \times 10^4$ cél. L^{-1}) y en aguas de plataforma a los ~ 44 °S ($2,7 \times 10^4$ cél. L^{-1}) (Fig. 5.15).

Los ejemplares del género *Alexandrium* analizados mediante microscopía y a partir de muestras de red durante esta campaña se asignaron a tres taxones: complejo de especies *A. tamarense*, *A. aff. minutum* y *A. ostenfeldii*. Las células correspondientes al complejo *A. tamarense* fueron las más frecuentes y con mayor abundancia relativa. Se observaron en 22 estaciones de muestreo, principalmente en aguas de la plataforma desde los 39 a los 47 °S (Fig. 5.16 A). Sus abundancias relativas variaron entre 29 y 100 %, con un promedio de 94 %. *Alexandrium aff. minutum* se encontró en cuatro estaciones correspondientes al talud a los ~ 40 y 44 °S y a aguas cercanas a Península Valdés (Fig. 5.16 B). Sus abundancias relativas fueron bajas, variando del 6 al 20 %. *Alexandrium ostenfeldii* se detectó en nueve estaciones correspondientes al talud a los ~ 40 y 44 °S, a Península de Valdés y al sur de la Provincia de Buenos Aires (Fig. 5.17 C). Las abundancias relativas variaron entre un 0,5 y 100%, con un promedio de 52%.

A pesar de las altas abundancias relativas del complejo *A. tamarense* determinadas a partir de técnicas de microscopía, mediante la aplicación de primers específicos se detectaron únicamente bajas señales correspondientes a *A. catenella* (= ribotipo I del complejo *A. tamarense*). Por otro lado, la secuenciación del material genético obtenido a partir del aislamiento de células de la estación 27 (Península Valdés) permitió corroborar la especie *A. catenella*, mostrando cercanía filogenética con la cepa MDQ1096 de Argentina (Fig. 5.17).

Los análisis moleculares confirmaron la presencia de *A. minutum* en una de las estaciones frente a Península Valdés y en otras ocho estaciones correspondientes al talud a los ~ 40 y 44 °S y al sur de Provincia de Buenos Aires, en las cuales no se encontraron células similares a *A. minutum* mediante análisis microscópicos (Fig. 5.16 B). Así también, *A. ostenfeldii* fue detectado en diez de las once estaciones analizadas con técnicas moleculares, de las cuales en tres no se hallaron células vegetativas durante los análisis microscópicos (Fig. 5.16 C).

Además de las células vegetativas móviles del género *Alexandrium* también se encontraron quistes de película en siete estaciones. Estos quistes se diferencian de las células vegetativas móviles por presentar una forma más esférica, un mayor tamaño (~ 50 μm), un citoplasma granuloso y una cubierta celular muy delgada luego de la pérdida de la teca (Cembella et al. 2000) (Fig. 5.18). Algunos ejemplares, sin embargo, conservaban parte de la teca adherida a la cubierta externa.

Las tres especies encontradas durante la C3 se hallaron en rangos de temperatura muy similares, entre ~ 8 y 13 °C, y a salinidades entre ~ 33 a 34 . Las densidades celulares máximas de las tres especies se encontraron a 11 °C y a una salinidad de $33,2$.

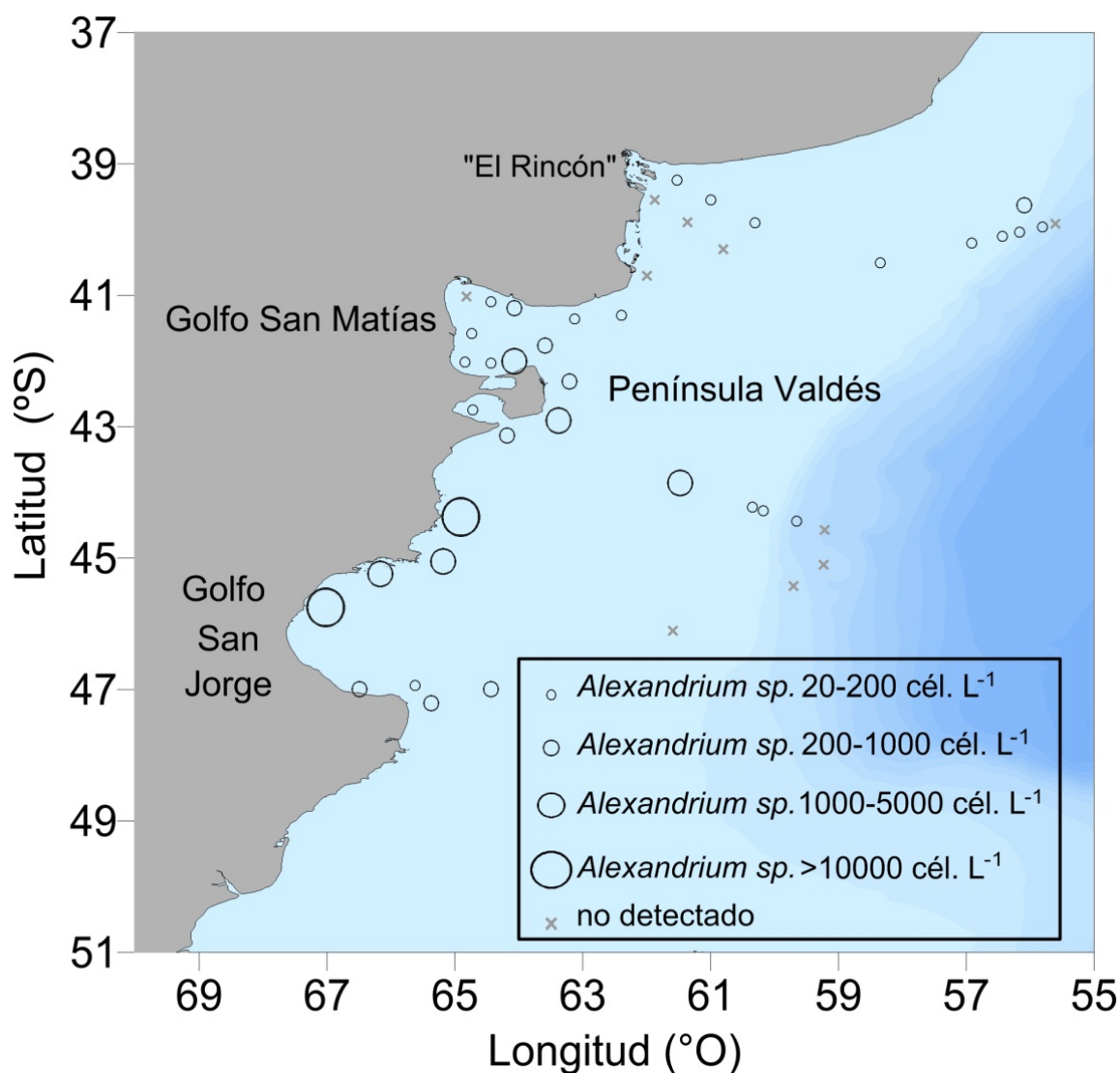


Fig. 5.15: Distribución y abundancia del género *Alexandrium* en muestras de botella durante la C3.

Toxinas asociadas

Durante la C3 se detectaron tanto TPM como SPX. Las TPM se hallaron en el 60 % de las estaciones, en concentraciones totales entre $0,1$ y $1,156$ ng LR^{-1} . En promedio, el 98% de TPM total se detectó en la fracción de $20\text{-}50\text{ }\mu\text{m}$, representando en cada estación entre el 80 y 100% del contenido total. Se encontraron ocho análogos

diferentes de TPM: GTX 1/4, GTX 2/3, C1/2, STX y NEO-STX. Las GTX1/4 dominaron el perfil en casi todas las muestras (Fig. 5.19), representando entre el 23 y 97 % del total de TPM (promedio: 78%), mientras que los análogos GTX 2/3 se encontraron en proporciones entre 2 y 66 % (promedio: 14%) y dominaron el perfil en una única estación (E: 16).

Las C1/2 representaron entre el 1 y 26 % del total de TPM (promedio: 7 %), y STX y NEO-STX fueron los análogos menos frecuentes y abundantes, y no superaron el 4 % del total de TPM con promedios menores al 1 %.

Las máximas concentraciones de TPM se hallaron en el Golfo San Jorge y en aguas abiertas adyacentes, asociadas a la presencia de células del género *Alexandrium* (Fig. 5.20). La correlación entre células y TPM fue alta y significativa ($r= 0,88$ $p < 0,05$). Las cuotas celulares de TPM estimadas para *Alexandrium* sp. se encontraron todas por debajo de los $0,8 \text{ pg cél.}^{-1}$ ($n=23$).

Mediante análisis de toxinas lipofílicas se detectó la presencia de SPX asociados a la presencia de *A. ostenfeldii* (Fig. 5.21), mostrando también una correlación alta y significativa ($r= 0,81$ $p < 0,05$). El SPX1 fue el análogo más frecuente y abundante, presente en el 23% de las estaciones en concentraciones entre 28 y 2.747 ng LR^{-1} , mientras que el 20-Me SPX-G se detectó solo en dos estaciones, en las que representó el 0,02 y 1,7 % del contenido total de SPX. Los mayores porcentajes (84 % a 100 %) de SPX se detectaron en la fracción de 20-50 μm , con la excepción de dos muestras (E 1 y 4) de la fracción de 50-200 μm en las que se encontraron respectivamente el 50 y 38 % de las concentraciones de SPX. En estas muestras se detectaron también células de *A. ostenfeldii* ó quistes de película de *Alexandrium* sp., aunque en bajas densidades relativas ($\leq 1,6 \text{ cél.} \times 10^3 \text{ LR}^{-1}$). Los valores máximos de SPX se hallaron en aguas del talud a los 40 y 44 °S, y en aguas de plataforma al sur de la Provincia de Buenos Aires. Las cuotas celulares de SPX estimadas para *A. ostenfeldii* variaron entre 15 y 36 pg cél.^{-1} ($n=3$).

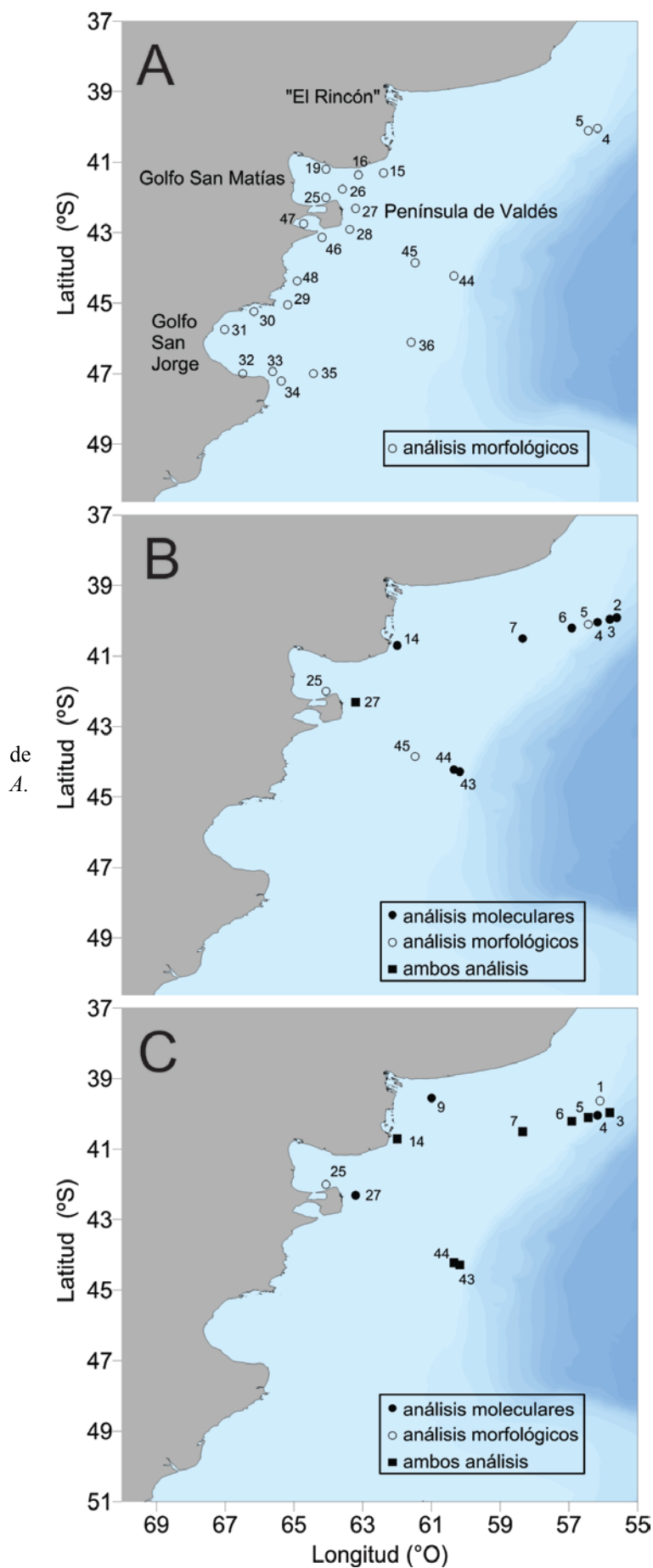


Fig. 5.16: Distribución de las especies del género *Alexandrium* determinadas a partir de análisis muestras de red durante la C3. A) complejo *A. tamarense/ A. catenella*, B) *A. minutum* y C) *A. ostenfeldii*.

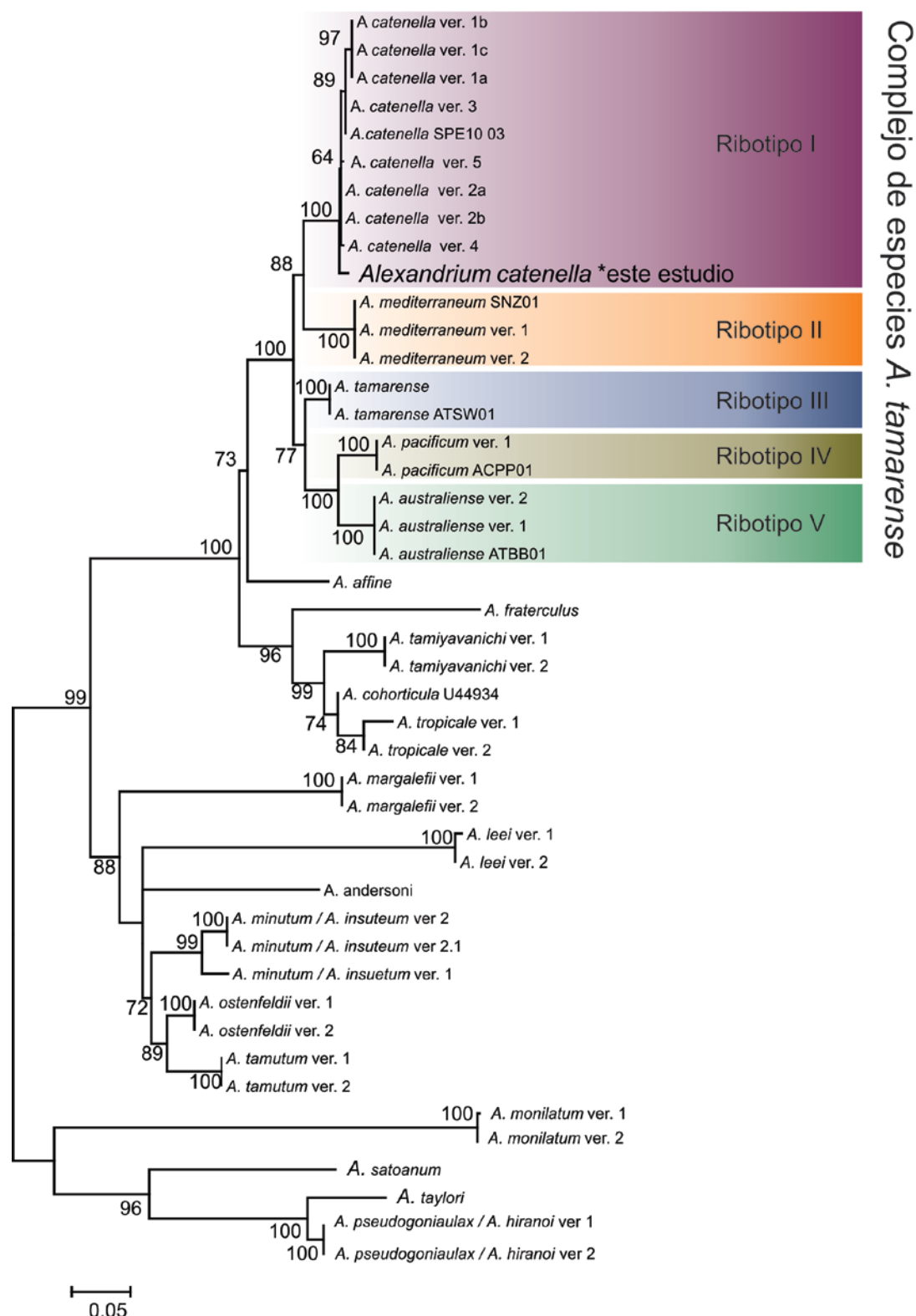


Fig. 5.17: Árbol filogenético de la región D1–D2 LSU rDNA el cual incluye secuencias obtenidas a partir de células de *A. catenella* aisladas manualmente de la muestra de red correspondiente a la estación 27 (Península Valdés). La alineación consiste de secuencias representativas de las diferentes especies del género *Alexandrium* agrupadas según el criterio indicado en John et al. (2014).

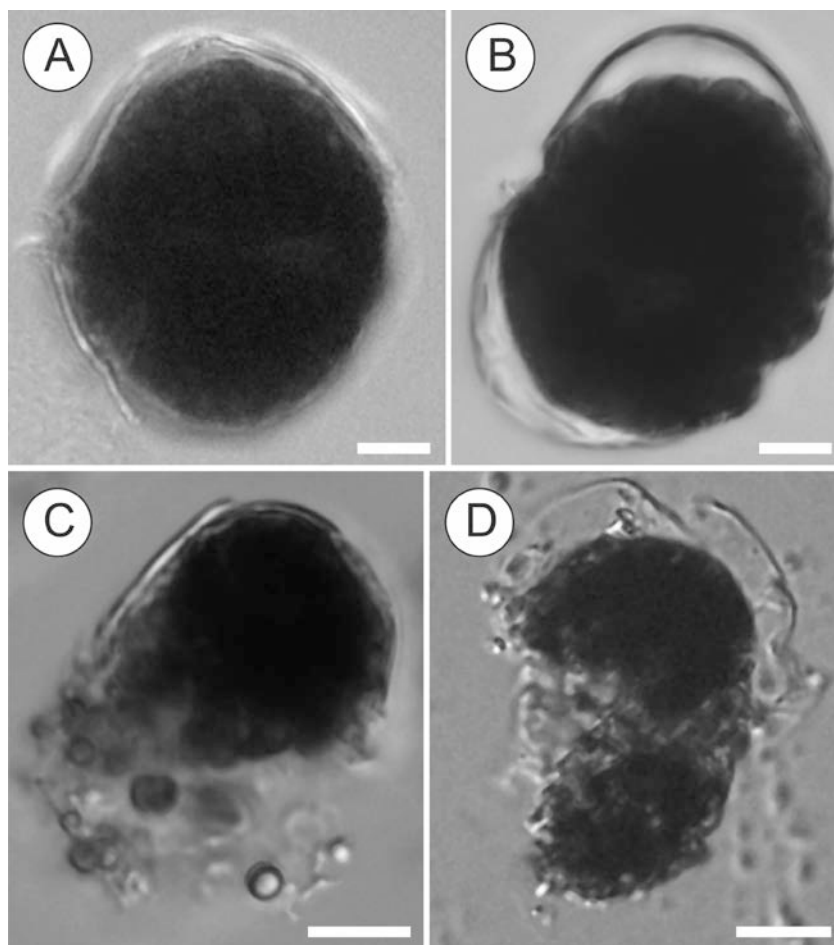


Fig. 5.18: Fotografías de quistes de película del género *Alexandrium* tomadas con microscopía óptica. A-D) Secuencia mostrando diferentes momentos del proceso de disección del quiste, note la frágil teca y el citoplasma en forma de gránulos.

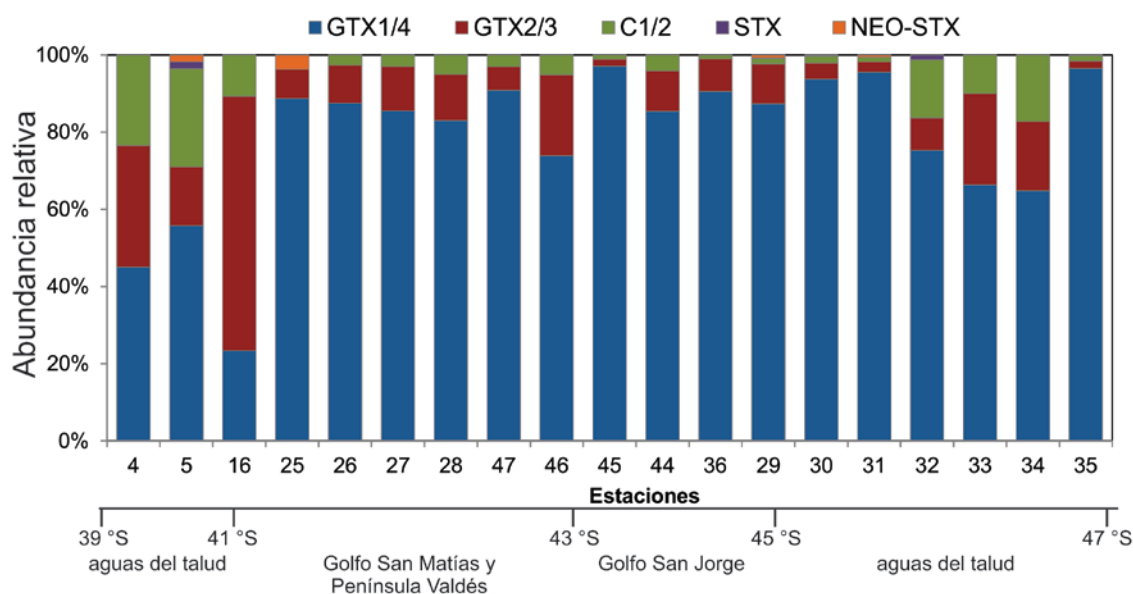


Fig. 5.19: Perfil de toxinas detectado a partir de la suma de las fracciones de 20-200 μm de muestras de red a lo largo de la C3.

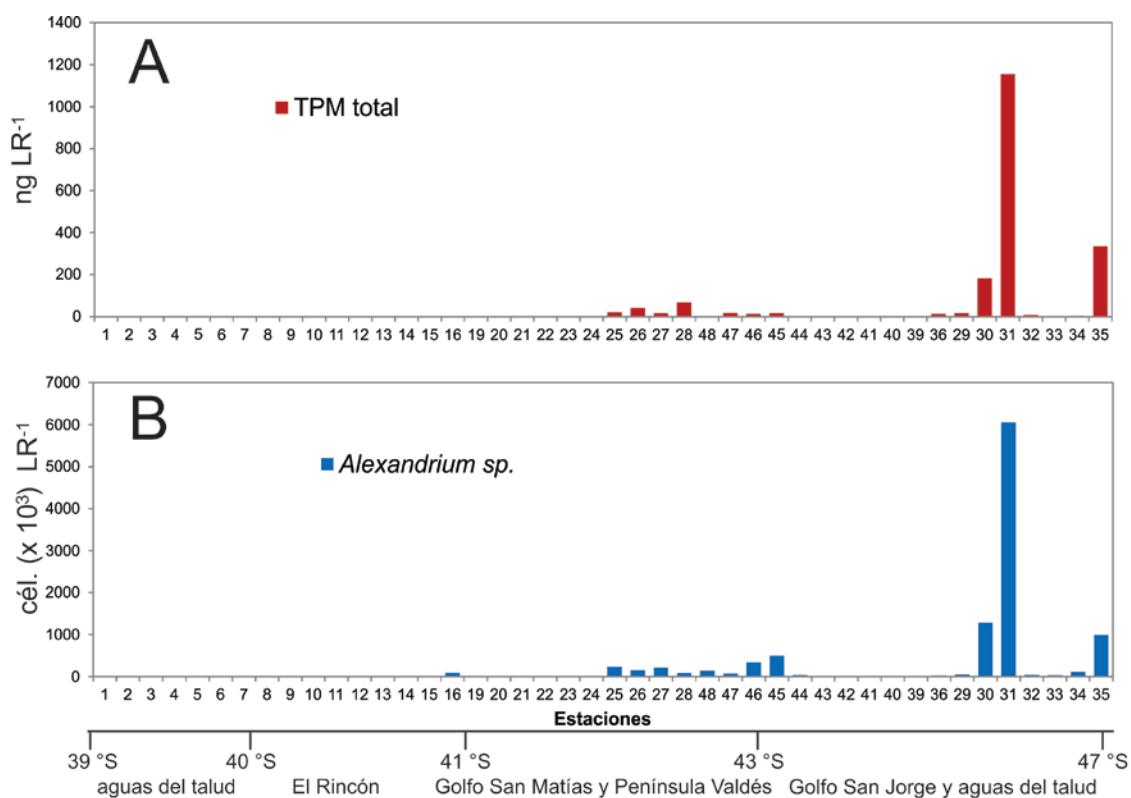


Fig. 5.20: (A) Concentración de TPM y (B) abundancia de células de *Alexandrium* sp. detectadas en las fracciones de 20-200 µm de muestras de red a lo largo de la C3.

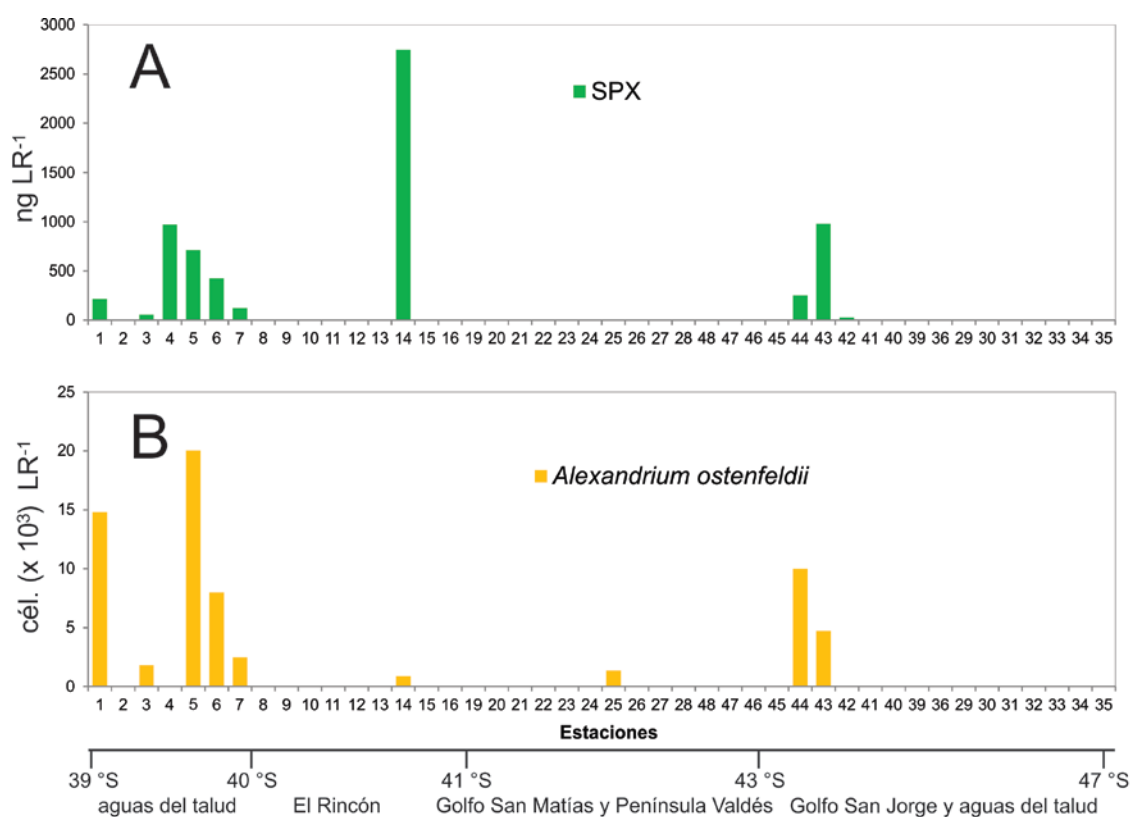


Fig. 5.21: (A) Concentración de SPX y (B) abundancia de células de *A. ostenfeldii* detectadas en las fracciones de 20-200 µm de muestras de red a lo largo de la C3.

5.3.4 Campaña de verano (C4)

Distribución y abundancia

El género *Alexandrium* no se detectó en muestras de botella de ninguna de las 7 estaciones realizadas. En muestras de red se encontraron células pertenecientes al complejo *A. tamarense* en las estaciones 1, 7 y 13, correspondientes a aguas frente a Península Valdés, al sur del Golfo San Jorge y frente a la Isla de los Estados (55 °S), respectivamente.

Las células del complejo *A. tamarense* se hallaron a temperaturas entre 8 y 15° C y a una salinidad de 33,5.

Toxinas asociadas

Se detectaron TPM en las estaciones 1 y 7, situadas frente a Península Valdés y al sur del Golfo San Jorge, en concentraciones de 76 y 522 ng LR⁻¹ respectivamente. Se encontraron dos análogos de TPM: C1/2 y GTX 2/3. Los análogos C1/2 se detectaron únicamente en la estación 7 en la fracción de 20-50 µm, en la cual alcanzaron la concentración máxima (348 ng LR⁻¹). Los análogos GTX2/3 fueron las únicas TPM halladas en la estación 1, en similar concentración en las fracciones de 20-50 µm y de 50-200 µm (46 y 30 ng LR⁻¹ respectivamente). Además se detectaron 174 ng LR⁻¹ en la estación 7, en la fracción de 20-50 µm.

La detección de TPM durante la C4 estuvo asociada a la presencia de células del complejo *A. tamarense* (Fig. 5.22); presentando una correlación alta y significativa ($r=0,88$ $p < 0,05$). Las cuotas celulares estimadas para el total de TPM fueron de 2 y 13 pg cél.⁻¹, con el mayor valor al sur del Golfo San Jorge. En la estación 13 no se detectaron TPM pero se observaron células del género *Alexandrium*, aunque en bajas densidades relativas (13×10^{-3} cél. LR⁻¹). En la fracción de 50-200 µm se detectó GTX2/3 en la estación 1.

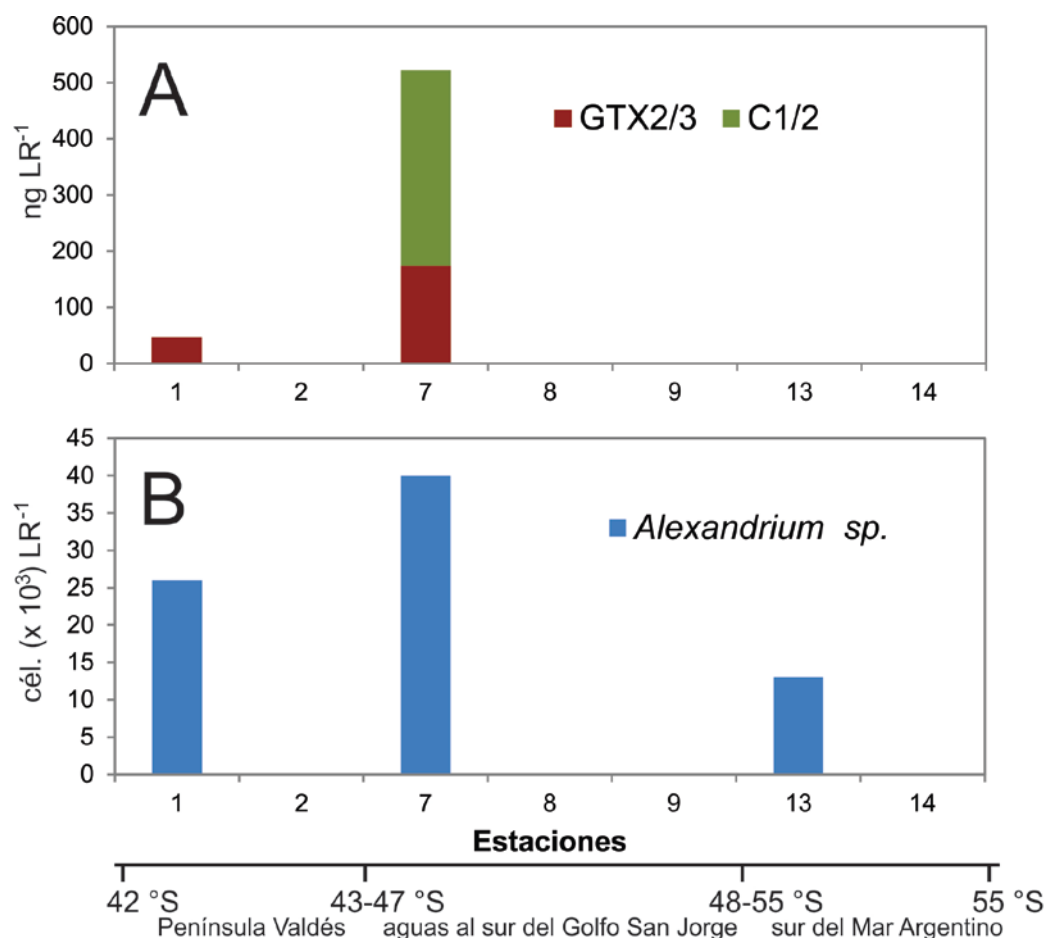


Fig. 5.22: (A) Concentración de toxinas detectadas en la fracción de 20-50 µm de muestras de red y (B) abundancia de células de *Alexandrium* sp. en muestras de red no fraccionadas a lo largo de la C4.

5.4 Discusión y Conclusiones

El género *Alexandrium* representó un componente frecuente del fitoplancton durante las cuatro expediciones, mostrando además una amplia distribución latitudinal desde los ~38 a los ~55,5 °S. Se observó tanto en aguas de la plataforma continental como en el talud y en un amplio rango de temperatura (8-18 °C) y salinidad (32,2-34,7), lo cual coincide con datos previos de su distribución en el Mar Argentino (Balech, 1995). Asimismo en términos cuantitativos fue un componente importante de los dinoflagelados, en especial durante la campaña de primavera, en la que representó hasta el 70% del total de los mismos y alcanzó las mayores abundancias (máx. $2,75 \times 10^4$ cél. L⁻¹) en los Golfos San Matías y San Jorge, y en aguas de plataforma cerca de Península Valdés. Esto coincide con los reportes previos de floraciones primaverales de *Alexandrium* en el Mar Argentino (Carreto et al., 2002) y podría estar relacionado con la

presencia de condiciones hidrográficas específicas, como una fuerte estratificación de la columna de agua en los golfos (Gagliardini & Rivas, 2004; Krock et al., 2015) y un marcado frente de mareas en la Península (Carreto, 1986; Acha et al., 2004), las cuales suelen favorecer la acumulación de dinoflagelados (Cloern et al., 2005; Jephson & Carlsson, 2009). En este sentido, los sitios muestreados durante las C2 y C3 cercanos a la Península Valdés se corresponden con la zona de transición del frente, la cual se caracteriza por presentar baja diversidad específica del fitoplancton y un predominio frecuente de dinoflagelados, entre ellos representantes del complejo *A. tamarense* (Carreto et al., 2007).

Los ejemplares de *Alexandrium* encontrados con mayor frecuencia y abundancia durante los análisis microscópicos de las cuatro campañas de muestreo analizadas pertenecieron al complejo *A. tamarense*, lo cual se condice con información previa para el Mar Argentino (Balech, 1995; Gayoso & Fulco, 2006). No obstante, en el presente estudio se hallaron por primera vez para la zona otras dos especies toxígenas, *A. minutum* y *A. ostenfeldii*, mediante análisis microscópicos y moleculares. Mientras que los representantes del complejo *A. tamarense* se encontraron principalmente en aguas de la plataforma desde los 39 a los 55 °S durante las 4 campañas, *A. minutum* y *A. ostenfeldii* se detectaron mayormente en aguas del talud y únicamente en primavera. Las densidades de *A. minutum* fueron bajas respecto de las otras dos especies detectadas. Esto podría deberse a que se trata de una especie que suele ocurrir en ambientes costeros ricos en materia orgánica, como estuarios o lagunas (Belin, 1993; Giacobbe et al., 1994; Vila et al., 2001), o incluso en pequeños puertos (Bravo et al., 2010), con temperaturas óptimas de crecimiento alrededor de los 15°C (Chapelle et al., 2015). Las aguas del Mar Argentino, mayormente influenciadas por la corriente fría de Malvinas (Piola & Matano, 2001) y con temperaturas promedio anuales alrededor de 13 °C (Rivas, 1994), podrían no ser propicias para el desarrollo de la especie.

Los representantes del complejo *A. tamarense* se caracterizaron por mostrar rasgos morfológicos variables, como la forma de las placas 1' y Sp y la ubicación y tamaño del poro ventral. Esta variabilidad en los caracteres morfológicos en miembros del complejo *A. tamarense* también ha sido observada en cepas del ribotipo I aisladas de la costa este de Groenlandia, especialmente en la morfología de la Sp y en la conexión, tamaño y forma de las placas 1' y 6'' (Tillmann et al., 2016a). Durante el presente estudio no se observaron cadenas de células, pero este no es un carácter estable ya que suele variar de acuerdo a condiciones ambientales (Jiang et al., 2010), y en particular

dentro del complejo *A. tamarense* donde es considerado plesiomórfico y no se utiliza actualmente como un indicador taxonómico de peso (John et al., 2003; Leaw et al., 2005).

Algunos especímenes hallados durante la C3 y asignados al complejo *A. tamarense* por medio de análisis microscópicos presentaron una forma más o menos ovoide y una placa Sp romboidal con poro de conexión, lo cual parecería concordar con la descripción de *A. acatenella* para especímenes de Japón (Balech, 1995; Yoshida et al., 2003). Según Balech (1995) esta especie puede distinguirse de *A. tamarense* por presentar una forma general más ovoide, con la epiteca de mayor largo que la hipoteca, una placa Sp más ancha y por la presencia de un poro de conexión. Sin embargo, el mismo Balech remarcó que la categorización de *A. acatenella* como especie separada de *A. tamarense* es dudosa. Si bien la variabilidad morfológica dentro del complejo *A. tamarense* es amplia y se requieren análisis moleculares para la determinación fehaciente a nivel específico, no es posible descartar la posibilidad de que las morfologías observadas por Balech (1995), al igual que las mencionadas como atípicas en el presente estudio, correspondan a un ribotipo diferente dentro del complejo, para el cual aún no se poseen cultivos ni datos moleculares.

Los análisis filogenéticos llevados a cabo sobre células aisladas durante la C3 ubicaron las secuencias obtenidas dentro del ribotipo I del complejo *A. tamarense*, lo cual concuerda con la información genética de una de las dos cepas del Mar Argentino analizadas hasta el momento (Penna et al., 2008). A pesar de ello, no se pudo confirmar la presencia de dicho taxón aplicando marcadores moleculares en muestras de campo, lo cual podría deberse a diferentes causas. Por un lado, la baja señal podría ser resultado de una mala calidad del ADN en las muestras. En este sentido, los falsos negativos son frecuentes en análisis moleculares de muestras de campo debido a la presencia de inhibidores de PCR en el medio, los cuales son extraídos junto con el ADN (Wilson, 1997; Park et al., 2007). Por otro lado, los resultados moleculares negativos para la detección de integrantes del complejo *A. tamarense* podrían deberse a la presencia del ribotipo V (= *A. australiense*) (John et al., 2014), para el cual no se utilizaron cebadores ni sondas específicas durante los análisis realizados en este estudio. Una última alternativa es que las poblaciones del complejo *A. tamarense* de Argentina comprendan especímenes con regiones SSU rDNA y LSU rDNA muy variables, de manera de no poder ser detectados con sondas diseñadas para poblaciones de otras regiones del mundo. En este sentido, cuando el método de PCR es aplicado a muestras

de campo debe considerarse la posibilidad de que la variabilidad en el contenido de ADN ribosómico y/o la alta variabilidad dentro de una misma población de *Alexandrium* a nivel local o regional afecten su eficiencia (Galluzzi et al., 2010; Toebe et al., 2013).

Los análisis morfológicos indicaron la presencia de células con características similares a *A. minutum* pero que no coincidieron completamente con su descripción clásica. Una de las diferencias encontradas fue que las células analizadas en este estudio presentaron un tamaño levemente mayor (23-35 μm) que el descrito en la literatura (15.5-29 μm , Balech, 1995). La característica morfológica más distintiva de *A. minutum* es la forma angosta (más larga que ancha) de la placa 6'' (Balech, 1995), la cual se observó en los especímenes analizados durante la C3. Asimismo, las dimensiones y forma de la placa 6'' resultaron ser similares a las descritas para células de *A. minutum* de Nueva Zelanda (MacKenzie and Berkett, 1997). Por otro lado, el grado de conexión entre las placas 4' y 6'' fue mayor en los especímenes analizados que en la descripción original. En este sentido una variación considerable en la conexión entre ambas placas se observó previamente en cultivos de *A. minutum* de Dinamarca (Hansen et al., 2003). Otra característica observada usualmente en *A. minutum* es una aparente desconexión entre la placa 1' y Po, causada por la presencia de una prolongación muy fina de la placa 1' (Balech, 1995), la cual se evidencia únicamente al diseccionar la teca. Las células analizadas durante este estudio presentaron siempre una prolongación de la placa 1' contactando con Po, al igual que en los cultivos de Francia analizados por Lily et al. (2005) y en poblaciones naturales de Jamaica (Ranston et al., 2007). Todos los especímenes asignados a *A. aff. minutum* durante este estudio presentaron un poro ventral. De acuerdo con la descripción clásica de *A. minutum*, el poro ventral se localiza en el margen posterior derecho de la placa 1' (Balech, 1995), sin embargo este no fue el caso de todas las células asignadas a la especie durante este estudio, ya que en algunas de ellas el poro se encontró ubicado en la región media de la placa 1'. A pesar de que la ubicación del poro fue variable en los ejemplares analizados, la presencia en sí del poro no es un carácter estable ya que análisis morfológicos y moleculares mostraron que su presencia o ausencia varía en cultivos de *A. minutum* (Kim et al., 2002).

Si bien los análisis morfológicos no coincidieron totalmente con descripciones previas de *A. minutum* para otros lugares del mundo, su presencia fue confirmada por primera vez en el Mar Argentino mediante la aplicación de técnicas moleculares. Esto es un hecho relevante ya que esta especie suele presentar un perfil tóxico caracterizado

por el dominio de gonyautoxinas (=GTX), las cuales presentan un alto nivel de toxicidad frente a vertebrados (Cembella et al., 1987; Cusick & Sayler, 2013).

La tercera especie toxígena de *Alexandrium* hallada durante este estudio mediante la aplicación de técnicas tanto moleculares como de microscopía, fue *Alexandrium ostenfeldii*, la cual había sido observada previamente en el Canal de Beagle, Tierra del Fuego (Almandoz et al., 2014), pero nunca en aguas abiertas del Mar Argentino. *A. ostenfeldii* se caracteriza por presentar un poro ventral de gran tamaño y una placa 1' alargada y oblicua (Balech, 1995), lo cual facilita su identificación microscópica respecto de las otras dos especies del género encontradas. Al igual que los especímenes del Canal de Beagle, las células analizadas durante este estudio presentaron una placa 1' con márgenes derechos y rectos (característica de *A. ostenfeldii*) y una placa Sa en forma de A (característica de *A. peruvianum*). Esto apoya los resultados de Kremp et al. (2013), quienes proponen la existencia de una única especie que presenta variabilidad en las características morfológicas propuestas para la diferenciación de especies, entre ellas la forma de las placas Sa y 1'.

Los análisis de toxinas hidrofílicas revelaron la presencia de TPM en todas las campañas realizadas, con concentraciones máximas en otoño y primavera, particularmente en los Golfos San Matías y San Jorge, y aguas adyacentes a Península Valdés. A lo largo de las cuatro expediciones se detectaron varios análogos de TPM. Durante la C1 y C2 los más frecuentes y abundantes fueron los análogos GTX2/3 (5181 y 218 ng LR⁻¹ respectivamente), en la C3 los análogos GTX1/4 (1104 ng LR⁻¹) y en la C4 los análogos C1/2 (348 ng LR⁻¹). STX, NEO-STX y B1 se detectaron con menor frecuencia, sin embargo NEO-STX y STX alcanzaron altas concentraciones relativas en las C1 y C2 (647 y 207 ng LR⁻¹ respectivamente). Las cuotas celulares de TPM total estimadas durante las cuatro campañas para el complejo *A. tamarense* (C1, C2 y C4) y para el complejo *A. tamarense* más *A. aff. minutum* (C3) variaron entre 0,9 y 35,5 pg. cél.⁻¹. Los valores máximos se detectaron durante la C1 de otoño y C3 de primavera, en aguas abiertas frente a la Provincia de Buenos Aires y frente al Golfo San Jorge respectivamente, mientras que las cuotas celulares mínimas se hallaron en regiones costeras. Un patrón similar se observó mediante estudios de toxicidad realizados con cultivos del complejo *A. tamarense*, los cuales presentaron cuotas celulares con los máximos correspondiente a cepas aisladas frente a Península Valdés y los mínimos a cepas de zonas costeras de los Golfos San José y Nuevo (Montoya et al. 2010). Así también las máximas densidades celulares y niveles de toxicidad del género

Alexandrium estimados a partir de muestras de campo se presentan mar adentro y asociadas a frentes (Carreto et al., 1986; Méndez et al., 1996).

La detección de TPM mostró generalmente una buena asociación con la presencia de células del género *Alexandrium*, aunque hubo algunas excepciones. En algunos casos se encontraron células de *Alexandrium* y no hubo detección de TPM; esto se observó en una estación de la C1, en seis estaciones de la C2, en nueve estaciones de la C3 y en una estación de la C4. Sin embargo, las densidades celulares en estos casos fueron bajas ($\leq 20 \text{ cél. } 10^3 \text{ LR}^{-1}$), excepto durante la C2 en la cual alcanzaron las $119 \times 10^3 \text{ cél. LR}^{-1}$. La ausencia de TPM en este último caso podría deberse a la presencia de poblaciones no toxígenas del género. En este sentido, los análisis morfológicos llevados a cabo durante este estudio asignaron la mayoría de las células al complejo *A. tamarense*, el cual se caracteriza por presentar dos ribotipos (I y IV) que poseen el gen *sxtA4*, responsable de la producción de TPM, dos que no lo poseen (II Y II), y uno (V) que puede o no poseerlo dependiendo de la cepa (John et al., 2014). Por lo tanto, no se puede descartar la posibilidad de que ribotipos no toxígenos del complejo hayan estado presentes, al menos en bajas densidades. Por otro lado, en diez estaciones de la C1 y en seis estaciones de la C2 se detectaron TPM, en las fracciones de 20-50 y 50-200 respectivamente, pero no se observaron células de *Alexandrium*. En estos casos las toxinas podrían haber estado acumuladas en predadores de *Alexandrium* sp., como copépodos u otros dinoflagelados, que pueden acumular las toxinas y transportarlas a través de la red trófica (Tester et al., 2000).

Los perfiles de toxinas del género *Alexandrium* han sido utilizados como marcadores químicos con el fin de diferenciar y caracterizar diferentes especies, e incluso poblaciones geográficas dentro de una misma especie (Anderson et al., 2012a). Sin embargo, este enfoque debe ser interpretado cuidadosamente ya que algunas especies del género, incluyendo las pertenecientes al complejo *A. tamarense*, presentan una gran variabilidad de perfiles tóxicos dependiendo de diferencias genéticas entre cepas, incluso dentro de una población morfológicamente homogénea (Alpermann et al., 2010; Anderson et al., 2012a). En este sentido, durante este estudio se encontró una gran variabilidad de perfiles a lo largo de las cuatro expediciones, lo cual también había sido registrado en estudios previos de toxinas tanto en cultivo como en campo para el área de estudio. La dominancia de GTX1/4 observada durante la C3 coincide con estudios previos de campo realizados en el Golfo San Jorge por Andrinolo et al. (1999) y a lo largo del Mar Argentino por Montoya et al. (2010). Un perfil similar también

caracterizó a dos cepas del complejo *A. tamarense* aisladas del Golfo San Jorge (Krock et al., 2015) y a una aislada de Península Valdés (Montoya et al., 2010). Por otro lado, la dominancia de C1/2 encontrada durante la C4 coincide con los perfiles descritos por Carreto et al. (2001) y Montoya et al. (2010) para cultivos del complejo *A. tamarense* realizados a partir de poblaciones de distintas regiones de Argentina. Los perfiles encontrados más frecuentemente durante las C1 y C2, dominados por GTX2/3, coinciden con los presentados por la población de otoño de Mar del Plata, caracterizada por una baja concentración de toxinas. Asimismo, un cultivo del complejo *A. tamarense* aislado del Golfo Nuevo también presentó un alto contenido de GTX3 (Montoya et al., 2010). Esta variabilidad en perfiles presentada por el complejo *A. tamarense* también es frecuente en poblaciones de otras regiones del mundo como el Mar del Norte y Chile (Alpermann et al., 2010; Aguilera et al., 2013).

Si bien en este estudio la producción de TPM estuvo asociada principalmente a representantes del complejo *A. tamarense*, se debe considerar el posible aporte de TPM por parte de *A. minutum* durante la C3, durante la cual los perfiles de toxinas estuvieron dominados por GTX1/4. Análisis previos demostraron que *A. minutum* presenta perfiles muy estables dominados por los análogos mencionados (Cembella et al., 1987), por lo tanto no es posible descartar que esta especie haya contribuido con las altas proporciones de GTX (>80%) detectadas durante la C3, que además fue la única campaña en la que se encontraron células de *A. minutum*. La presencia de *A. minutum* en la comunidad planctónica del Mar Argentino, aunque sea en bajas densidades, también explicaría las diferencias en toxicidad encontradas por Montoya et al. (2010) en muestras de campo con altas proporciones de GTX 1/4, respecto de los contenidos y perfiles presentados por las cepas cultivadas, las cuales presentaron mayores proporciones de C 1/2.

La otra especie del género detectada únicamente durante la C3 fue *A. ostenfeldii*, la cual es conocida en algunas regiones como productora de TPM (Mackenzie et al., 1996; Cembella et al., 2000). El hecho de que *A. ostenfeldii* sea capaz de sintetizar tanto TPM como SPX y GYM, pero no necesariamente los tres grupos de toxinas en todos los casos, hace muy difícil la interpretación de los perfiles en estudios de campo en los que se encuentran más de una especie al mismo tiempo. A pesar de ello, dado que durante este estudio *A. ostenfeldii* se encontró junto con la detección de TPM únicamente en seis estaciones y siempre en abundancias menores que el complejo *A. tamarense*, mientras que en muestras con dominancia de *A. ostenfeldii* se detectaron SPX como principales

toxinas, se puede inferir que las poblaciones de *A. ostenfeldii* analizadas durante la C3 estuvieron caracterizadas por la producción de SPX exclusivamente, o al menos como principales componentes. Esto concuerda con el perfil hallado para la cepa de *A. ostenfeldii* aislada del Canal de Beagle (Almandoz et al., 2014). De acuerdo a la literatura parecería que las poblaciones de *A. ostenfeldii* tienden a producir TPM exclusivamente en aguas salobres o en áreas costeras (Tomas et al., 2012; Kremp et al., 2013; Burson et al., 2014). Sin embargo, hasta el momento, las condiciones específicas bajo las cuales *A. ostenfeldii* produce o no TPM no se encuentran totalmente dilucidadas (Suikkanen et al., 2013).

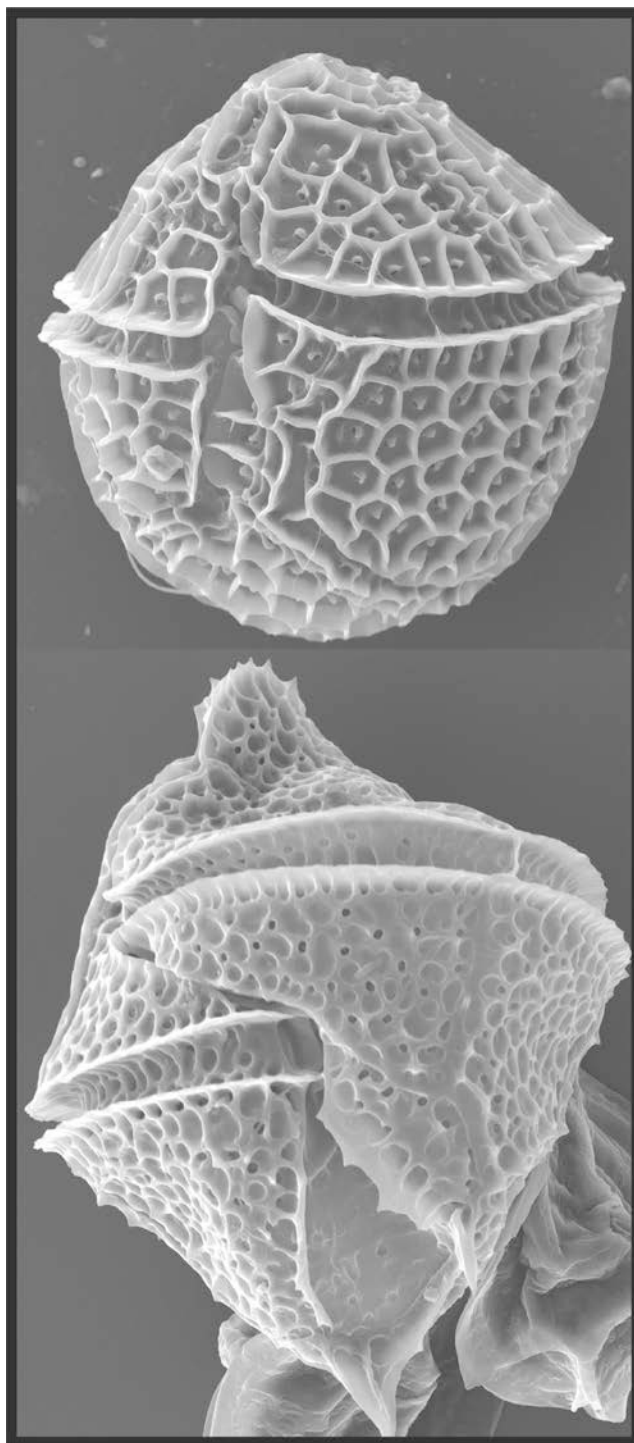
Los análisis de toxinas lipofílicas llevados a cabo durante este estudio detectaron la presencia de SPX únicamente durante la C3 y en asociación con la presencia de *A. ostenfeldii*, especie considerada como la única productora de estos compuestos (Cembella et al., 2001; Franco et al., 2006). El perfil detectado fue similar al encontrado en el cultivo del Canal de Beagle (Almandoz et al., 2014), con predominio de SPX-1 y 20-Me-G en menor proporción. La marcada dominancia de SPX-1 también coincide con el perfil presentado por los grupos I y II de *A. ostenfeldii* definidos por Kremp et al. (2013), los cuales incluyen cepas de Estados Unidos, España y el Reino Unido.

Al igual que en el caso de las TPM y representantes del complejo *A. tamarense*, en algunos casos no se encontró una clara asociación entre la presencia de *A. ostenfeldii* y SPX, aunque ello sucedió únicamente en tres estaciones. En una de ellas no se detectaron toxinas pero se hallaron bajas abundancias de células ($1,4 \text{ cel.} \times 10^3 \text{ LR}^{-1}$), mientras que en las otras dos estaciones se halló el caso opuesto, con presencia de SPX pero no de células de *A. ostenfeldii*. En el primer caso la ausencia de toxinas podría deberse a la presencia de SPX por debajo del límite de detección del método químico aplicado, o a la presencia de cepas no productoras de SPX (Salgado et al., 2015). En el segundo caso la detección de SPX pudo deberse a la transferencia de toxinas a través de la red trófica a causa de interacciones depredador-presa (Tester et al., 2000), lo cual también explicaría las altas concentraciones relativas de SPX ($270\text{-}587 \text{ ng NT}^{-1}$) detectadas en dos muestras de la fracción de 50-200 μm . Asimismo la presencia de quistes de película en varias estaciones de la C3 también podría haber contribuido a las inconsistencias entre la presencia de células y toxinas. Los quistes de película derivan de células vegetativas que pierden la teca, de manera que no presentan placas que puedan utilizarse en la diferenciación taxonómica de especies (Balech, 1995). Para algunas especies de *Alexandrium* que presentan tecas frágiles, como *A. ostenfeldii*, estos

quistes pueden formarse rápidamente durante la toma de muestras de red y su posterior manipulación (Cembella et al., 2001); u ocurrir naturalmente como parte del ciclo de vida (Figuerola et al., 2006, 2008). En consecuencia, la presencia de quistes de película del género *Alexandrium* podría explicar la detección de toxinas en estaciones en las que no se hallaron células vegetativas. De igual modo, podría explicar la detección de especies de *Alexandrium* mediante técnicas moleculares en las estaciones 4, 9, 27 y 43 de la C3 en las cuales no se encontraron células móviles del género utilizando microscopía. La presencia de SPX se detectó en forma reciente en bivalvos colectados en la costa de la Provincia de Buenos Aires (Turner & Goya, 2015) y en plancton y moluscos del Canal de Beagle (Almandoz et al., 2014), pero este estudio representa el primer reporte de SPX en muestras de plancton de aguas del talud y plataforma del Mar Argentino. Las cuotas celulares estimadas para SPX (15-36 pg cél.⁻¹) en este estudio resultaron ser alrededor de 50 veces mayores que las estimadas para el cultivo del Canal de Beagle, (0.74 pg cél.⁻¹) (Almandoz et al., 2014) y también fueron mayores que las presentadas por cultivos del Mediterráneo (Salgado et al., 2015) y Dinamarca (Otero et al., 2010; Medhioub et al., 2011). Por el contrario, resultaron menores que las estimadas para cepas de Canadá, las cuales presentaron cuotas que variaron entre ~50 y 95 pg cél.⁻¹ (John et al., 2001) y también para cepas de Estados Unidos cultivadas en medio repleto de nutrientes o expuestos a déficit de fósforo (73 y 96 pg cél.⁻¹ respectivamente) (Tatters et al., 2012).

La identificación fehaciente de especies del género *Alexandrium* mediante características morfológicas es una tarea compleja y la información obtenida aplicando técnicas de microscopía suele ser insuficiente, por lo cual resulta de suma importancia la aplicación de técnicas moleculares (Groben et al., 2004; John et al., 2005). Sin embargo, la utilización exclusiva de técnicas moleculares tampoco parece ser una opción adecuada para la identificación de especies. Esto se hace evidente al analizar las discrepancias encontradas entre los datos obtenidos mediante análisis morfológicos y moleculares durante la C3 de este estudio. Los resultados sugieren la necesidad de aplicar ambos enfoques de manera complementaria en futuros análisis de composición y distribución del género *Alexandrium* en el Mar Argentino. El hallazgo de nuevas especies toxígenas del género *Alexandrium* en el área de estudio evidencia dos hechos importantes y no necesariamente excluyentes: la posibilidad de introducciones recientes de especies toxígenas y la falta de estudios con técnicas apropiadas para analizar su diversidad específica.

Capítulo 6: Protoceratium reticulatum, Gonyaulax spinifera y toxinas asociadas



6.1 Introducción

Los géneros *Protoceratium* y *Gonyaulax* pertenecen al orden Gonyaulacales y ambos poseen una morfología general similar. El género *Protoceratium* se caracteriza por su forma elipsoidal, sin espinas ni hombros, pequeño tamaño y areolas bastante fuertes. El cingulum se encuentra levemente desplazado y no presenta entrecruzamiento. Su fórmula tabular (Po, 3-4', 0-1a, 6", 6C, 6S, 6"', 2''') es muy difícil de verificar en los especímenes completos, de manera que el contorno celular es el carácter más utilizado en su identificación. El género *Gonyaulax* presenta mayor cantidad de placas epitcales (Po, 3-4', 0-3a, 6", 6C, 6"', 2''') y tamaños y formas más variables. Puede o no presentar un cuello y hombros, posee una o más espinas antapicales y un cingulum descendente con marcado desplazamiento y de extremos entrecruzados (Balech, 1988; Dodge, 1989) (Fig. 6.1). Ambos géneros además pueden diferenciarse por algunas características de la ultraestructura del aparato flagelar y del complejo del poro apical, aunque para la observación de dichos caracteres es necesario un análisis con microscopía electrónica (Hansen et al., 1996/1997).

La especie *Protoceratium reticulatum* fue descrita en el siglo XIX como *Peridinium reticulatum* por Claparède & Lachmann (1858–1859) y luego transferida al género *Protoceratium* por Bütschli (1885). Casi 100 años después, Reinecke (1967) describe una nueva especie, *Gonyaulax grindleyi*, la cual luego fue considerada como sinónimo de *Protoceratium reticulatum* de acuerdo a estudios morfológicos (Hansen et al., 1996/1997).

Por otro lado, *Gonyaulax spinifera* presenta una historia compleja en cuanto a taxonomía y filogenia. Hasta el momento no se ha determinado si se trata de una única especie o de un complejo de especies, dado que su variabilidad molecular sugiere la presencia de varias especies crípticas (Dodge et al., 1989; Tomas et al., 1997) entre las cuales se incluye a *G. digitalis* (Riccardi et al., 2009).

P. reticulatum fue la primera especie en ser considerada como productora de yessotoxinas (YTX) (Satake et al., 1997; MacKenzie et al., 1998), un grupo de aproximadamente 100 análogos de toxinas lipofílicas caracterizadas como poliéteres disulfatados (Miles et al., 2005) (Fig. 6.2). Las YTX presentan cardiotoxicidad en ratones tras ser inyectados intraperitonealmente (Terao et al., 1990; Aune et al., 2002) y citotoxicidad frente a algunas líneas celulares de tumores humanos (Konishi et al.,

2004). El mecanismo de acción de las YTX aún no se conoce detalladamente, pero hay evidencia de que afectan la homeostasis de calcio en linfocitos humanos (De la Rosa et al., 2001). *P. reticulatum* ha sido asociada a mortalidad de fauna marina en Sudáfrica (Grindley & Nel, 1970; Horstman, 1981), a toxicidad en mariscos en Nueva Zelanda (MacKenzie et al., 1998), a muerte de ostras en Canadá (Cassis, 2005), y a la presencia de YTX en el mejillón azul de Noruega (Aasen et al., 2005) y de vieiras en Japón (Koike et al., 2006).

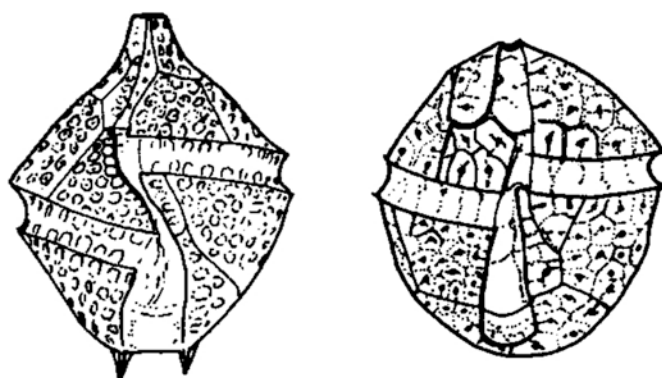


Fig. 6.1: Comparación morfológica entre A) *Gonyaulax spinifera* y B) *Protoceratium reticulatum*. Note las diferencias en el contorno general y en el desplazamiento y entrecruzamiento cingular (tomado de Balech, 1988).

Posteriormente, la producción de YTX y/o sus análogos se confirmó para otras dos especies de dinoflagelados, *Lingulodinium polyedrum* (Paz et al., 2004; Armstrong & Kudela, 2006) y *Gonyaulax spinifera* (Rhodes et al., 2006; Riccardi et al., 2009). *L. polyedrum* fue detectado de manera recurrente formando floraciones en el mar Adriático, durante las cuales también se detectaron YTX en muestras de plancton (Tubaro et al., 1998; Draisci et al., 1999). Asimismo, la producción de YTX por parte de *L. polyedrum* fue recientemente confirmada en cultivo mediante espectrometría de masas (LC-MS) (Paz et al., 2004; Armstrong & Kudela, 2006). Por otro lado, la presencia de *G. spinifera* en ausencia de *P. reticulatum* y *L. polyedrum* en el plancton estuvo asociada al establecimiento de vedas para la recolección de mariscos debido a la detección de YTX en moluscos recolectados en el Mar Adriático (Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, 2002). Luego la producción de YTX por parte de *G. spinifera* fue confirmada en un cultivo de Nueva Zelanda por medio del método de ELISA (Rhodes et al., 2006) y en dos cultivos obtenidos del Mar Adriático utilizando LC-MS (Riccardi et al., 2009).

P. reticulatum es una especie con una amplia distribución en mares y océanos de todo el planeta; en Sudamérica se registró en Chile, Brasil y Argentina asociado principalmente a aguas frías (Balech, 1988). En Chile, *P. reticulatum* produce floraciones con densidades celulares de más de 300.000 cél. L⁻¹ (Rossi and Fiorillo, 2010; Álvarez et al., 2011), y la presencia tanto de células vegetativas como de quistes se asoció a la detección de YTX en muestras de plancton (Krock et al., 2009a; Álvarez et al., 2011). Así también, en moluscos de Brasil se detectó la presencia de YTX (Schramm et al., 2010). Particularmente en Argentina, *P. reticulatum* ha sido recientemente asociada a la presencia de YTX en muestras de plancton del Golfo San Jorge, a partir de las cuales se estableció un cultivo que mostró un perfil de toxinas dominado por YTX (>95%), con la detección de otros cuatro derivados de YTX en forma minoritaria, los cuales no pudieron determinarse fehacientemente a causa de la falta de material de referencia (Akselman et al., 2015).

Por otro lado, *G. spinifera*, una especie cosmopolita y ampliamente distribuida en el Mar Argentino (Balech 1988; Akselman 1996), parece no contribuir significativamente a la producción de YTX en el área (Akselman et al., 2015). A pesar de que no existen registros de células vegetativas de *L. polyedrum* en el plancton del Mar Argentino, se han encontrado sus quistes en sedimentos correspondientes a una estación fija (EPEA) ubicada en las cercanías de Mar del Plata y en la zona común de pesca entre Argentina y Uruguay (Akselman et al., 2015).

En el presente capítulo se describen la distribución y abundancia de *P. reticulatum* y *G. spinifera* en el área de estudio junto con la detección y concentración de YTX en muestras de plancton.

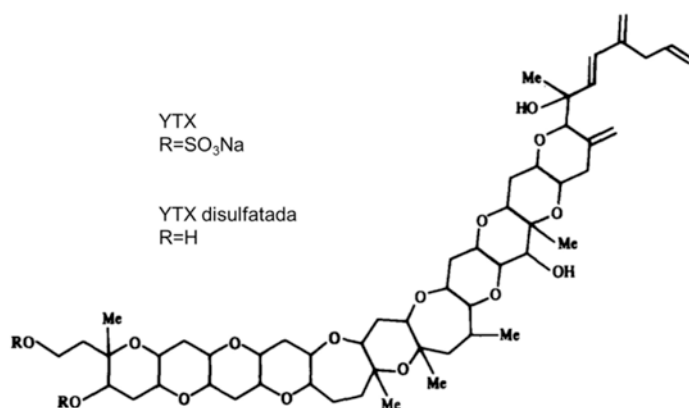


Fig. 6.2: Estructura química de la yessotoxina (YTX) y su análogo disulfatado.

6.2 Descripción morfológica de las especies encontradas

Protoceratium reticulatum (Claparède & Lachmann) Bütschli (Fig. 6.1)

Balech (1988): 169, Lam. 77, Figs. 1-5 (*Gonyaulax grindleyi*)

Sinónimos: *Peridiniopsis reticulatum* (Claparède & Lachmann) Starmach; *Peridinium reticulatum* Claparède & Lachmann; *Gonyaulax grindleyi* Reinecke.

Contorno ovoide, pentagonal a poligonal, sin cuello ni espinas. Epiteca con forma de domo, más pequeña que la hipoteca (Fig. 6.3 A, B). Areolación muy particular formada por un reticulado de areolas poligonales, cada una con una protuberancia central en forma de cresta, la cual posee un poro (Fig. 6.3 B, C). Cingulum muy excavado, con marcada areolación, descendente (1-1,5 veces su altura) y sin entrecruzamiento; sulcus angosto y corto (Fig. 6.3 C, D). Placa 1' con un poro en la región apical derecha (Fig. 6.3 C, D). Presencia de una placa intercalar (1a) en todas las células analizadas ($n = 20$) (Fig. 6.3 E-H) resultando en la siguiente fórmula tabular: Po, 3', 1a, 6'', 6c, s, 6''', 2''''.

Dimensiones: largo 39-55,5 μm (promedio 46 μm); ancho 33-48 μm (promedio 40 μm) ($n = 23$).

Gonyaulax spinifera (complejo de especies) Kofoid (Fig. 6.4)

Balech (1988): 166, Lam. 74, Figs. 1-4.

Sinónimos: *Peridinium levanderi* Lemmermann; *Spiniferites ramosus* (Ehrenberg) Mantell; *Gonyaulax levanderi* (Lemmermann) Paulsen; *Tectatodinium pellitum* Wall

Contorno celular caracterizado por la presencia de espinas antapicales bien desarrolladas (Fig. 6.4 A) y una estructura fuerte con cuello prominente y hombro derecho muy marcado (Fig. 6.4 A, B). Cingulum muy excavado y claramente descendente (2-2,5 veces su altura) con entrecruzamiento muy marcado (Fig. 6.4 C-E). Placa 6'' triangular con un borde izquierdo cóncavo (Fig. 6.4 C, D). Areolas casi circulares las cuales pueden o no estar perforadas o presentar poros entre ellas (Fig. 6.4 D-F). Presencia de dos (Fig. 6.4 D, E) o tres (Fig. 6.4 F) espinas antapicales.

Dimensiones: largo 37-69 μm (promedio 51 μm); ancho 32-55 μm (promedio 43 μm); ($n = 20$).

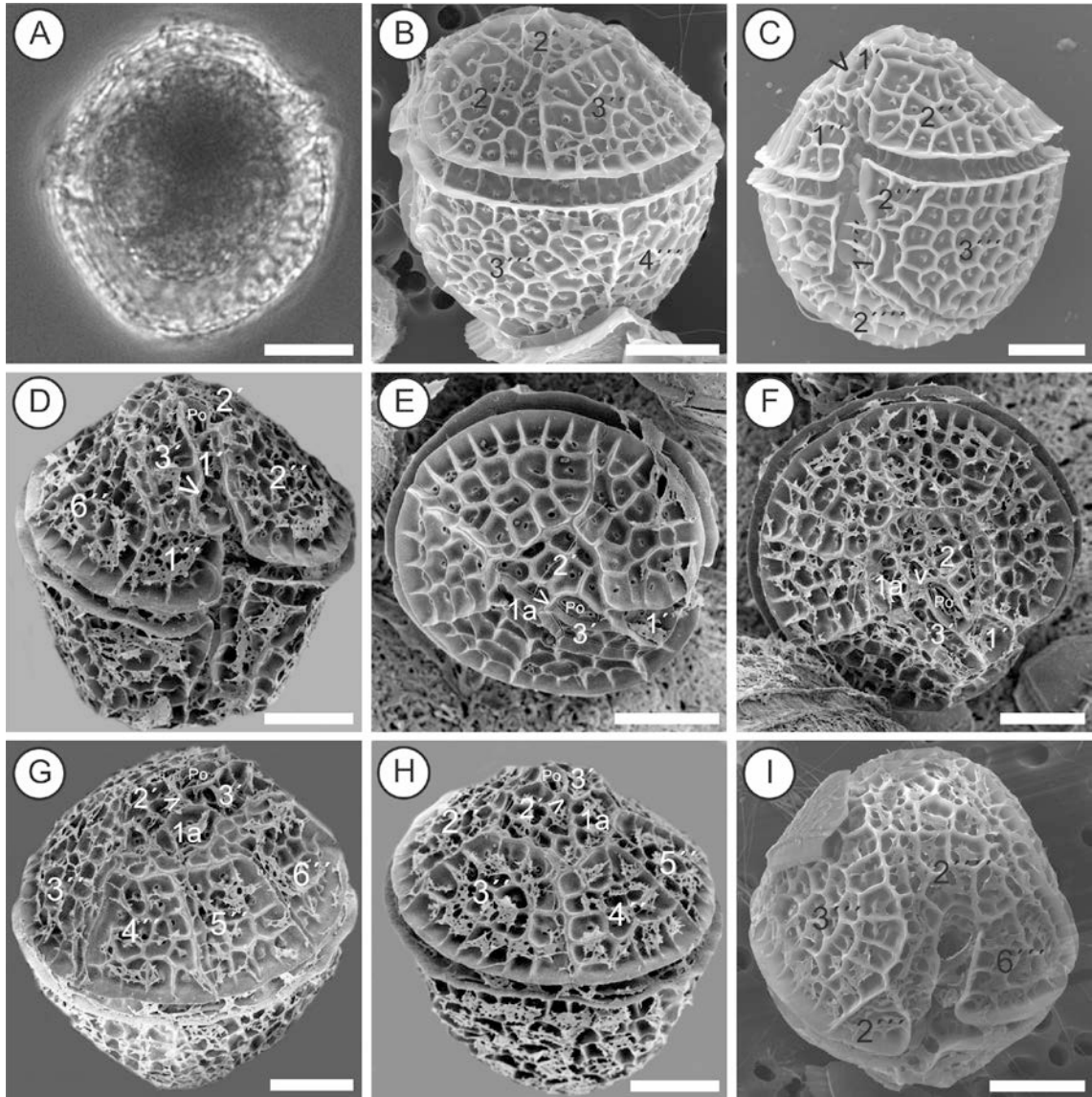


Fig. 6.3: Fotografías de *Protoceratium reticulatum* tomadas con microscopía óptica con contraste de fases (A) y electrónica de barrido (B-I). A, B) Vista general lateral. C, D) Vista ventral, note la presencia de un poro ventral en la placa 1' (flechas). E, F) Vista apical, note la presencia de la placa intercalar (1a) y la sutura entre las placas 2' y 3' (flechas). G, H) Vista dorso-apical, note la sutura entre las placas 2' y 3' (flechas). I) Vista antapical. Escala: 10 μ m.

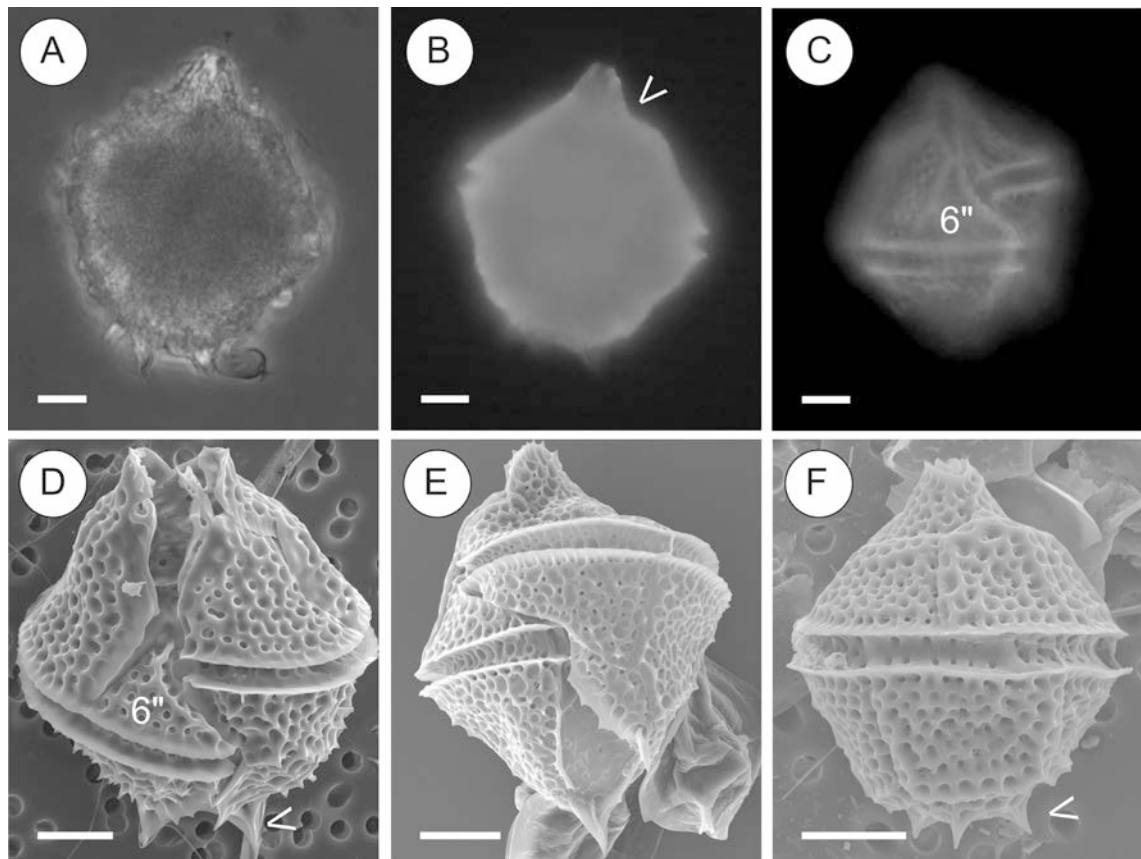


Fig. 6.4: Fotografías de *Gonyaulax spinifera* tomadas con microscopía óptica (A), óptica de fluorescencia (B, C) y electrónica de barrido (D-F). A, B) Vista general dorsal, note las espinas antapicales (A), el prominente cuello y el hombro derecho marcado (B, flecha). C) Vista ventro-lateral derecha, note la forma triangular de la placa 6" y el marcado desplazamiento descendente del cingulum. D) Vista ventro-apical, note el borde izquierdo cóncavo de la placa 6" y la presencia de dos espinas antapicales (flecha). E) Vista ventral, note el entrecruzamiento cingular. F) Vista dorsal, note la presencia de tres espinas antapicales (flecha). Escala: 10 μm .

6.3 Distribución, abundancia y toxinas asociadas

6.3.1 Campaña de otoño (C1)

Distribución y abundancia

La especie *P. reticulatum* estuvo presente en cuatro muestras de botella colectadas en el Golfo San Jorge y aguas circundantes (Fig. 7.5 A) en abundancias de 20 a 120 cél. L^{-1} que representaron entre el 0,1 y 1,3 % de la abundancia total de los dinoflagelados (promedio= 0,5 %). Adicionalmente se la encontró en una muestra de red colectada en aguas adyacentes a la boca del Golfo San Jorge (45 °S). Por su parte, se

detectaron representantes del complejo *G. spinifera* en tres muestras cuantitativas correspondientes al Golfo San Jorge y aguas circundantes, en las que representaron entre el 0,5 y 1,5 % de la abundancia total de los dinoflagelados (promedio= 0,8 %). El complejo *G. spinifera* se encontró además en tres muestras de red correspondientes a dos estaciones ubicadas en el Golfo San Jorge y a una al norte del golfo (44 °S) (Fig. 6.5 B).

El rango de temperatura en que se encontraron células de *P. reticulatum* fue de 12 a 14 °C y el de salinidad de 33,3 a 33,6. *G. spinifera* se encontró en un rango de temperatura de 12 a 16 °C y a salinidades de 33,4 a 33,9. Las densidades celulares máximas de ambas especies se presentaron a 13 °C y 33,4 de salinidad.

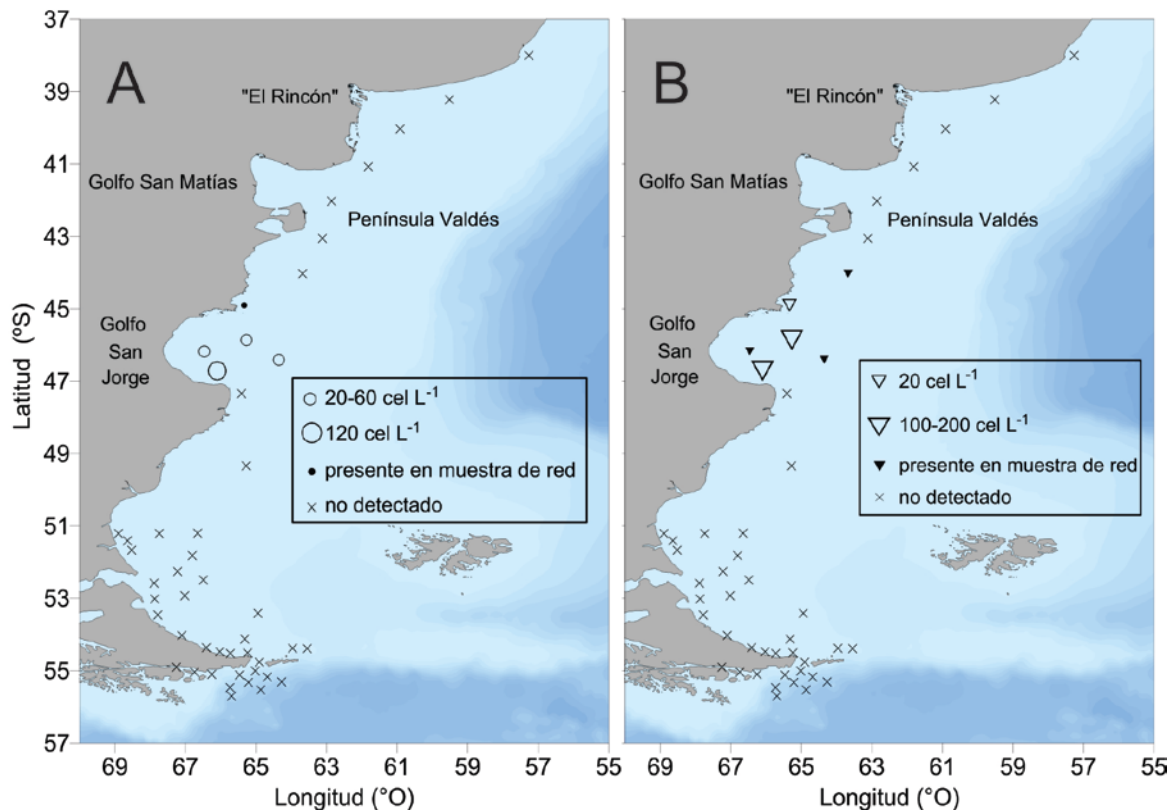


Fig. 6.5: Distribución y abundancia en muestras de botella y presencia en muestras de red de *Protoceratium reticulatum* (A) y *Gonyaulax spinifera* (B) durante la C1.

Toxinas asociadas

Se detectó la presencia de YTX en cinco estaciones correspondientes al Golfo San Jorge, en muestras de la fracción de 20 a 50 μm en concentraciones de 24 a 343 ng LR^{-1} . Adicionalmente se detectó YTX en tres muestras de la fracción de 50-200 μm correspondientes a estaciones de la misma zona.

En las cinco estaciones con detección de YTX (Fig. 6.6 A) también se encontraron células de *P. reticulatum* en muestras de red no fraccionadas, en abundancias entre 4 y 28 $\times 10^3$ cél. LR^{-1} ; presentando una correlación alta y significativa entre densidad celular y concentración de toxinas ($r=0,99$). Por otro lado, en cuatro de ellas también se encontraron células de *G. spinifera*, aunque siempre en menor abundancia que *P. reticulatum* (Fig. 6.6 B) y presentando una menor correlación ($r=0,87$). Las cuotas celulares de YTX estimadas para *P. reticulatum*, en las dos estaciones con densidades suficientes, fueron de 7,5 y 12,5 pg cél.^{-1} . Los datos de YTX y de cuotas celulares de la especie *P. reticulatum* correspondientes a esta campaña se encuentran publicados en Akselman et al. (2015).

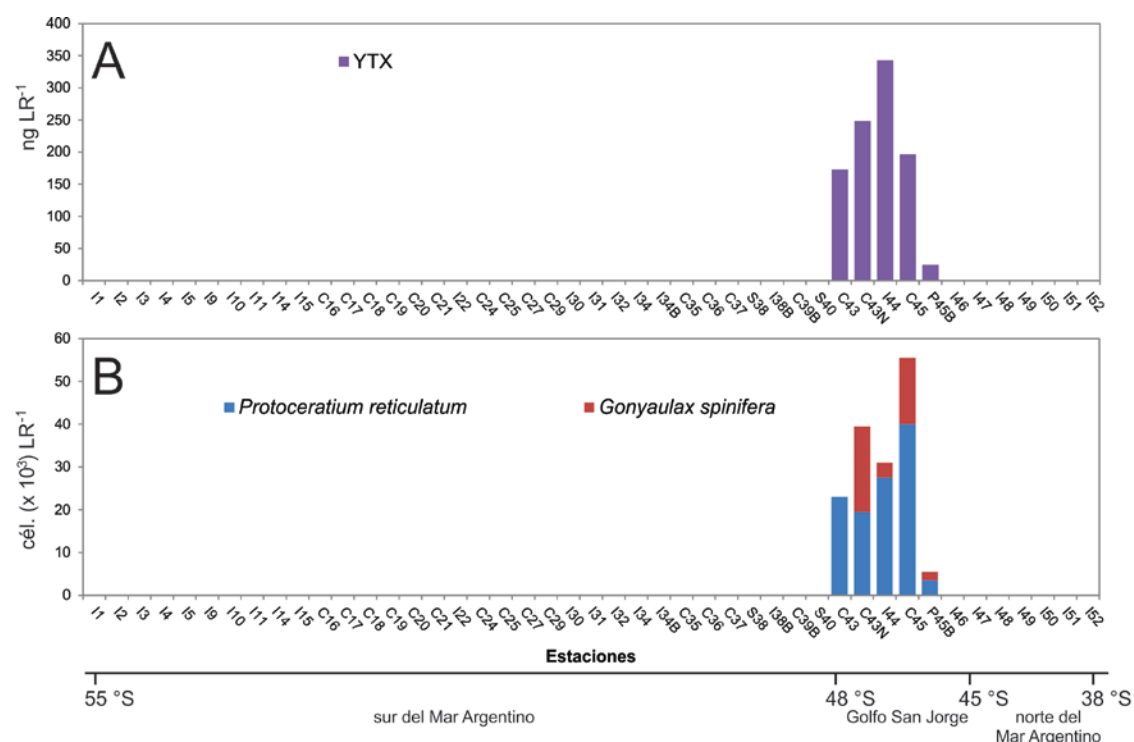


Fig. 6.6: Concentración de YTX (A) en la fracción de 20-50 μm y abundancia de células de *P. reticulatum* y *Gonyaulax spinifera* (B) en muestras de red no fraccionadas a lo largo de la C1.

6.3.2 Campaña de verano tardío (C2)

Distribución y abundancia

P. reticulatum no se detectó en ninguna de las muestras de botella ni de red de esta campaña. Por el contrario, el complejo de especies *G. spinifera* se encontró en nueve muestras de red correspondientes al Golfo San Matías (Fig. 6.7), en abundancias de 3 a 28×10^3 cél. LR⁻¹, pero no se detectó en ninguna muestra de botella. El rango de temperatura en que se encontraron células de *G. spinifera* fue de 14 a 18 °C.

Toxinas asociadas

No se detectaron YTX durante esta campaña.

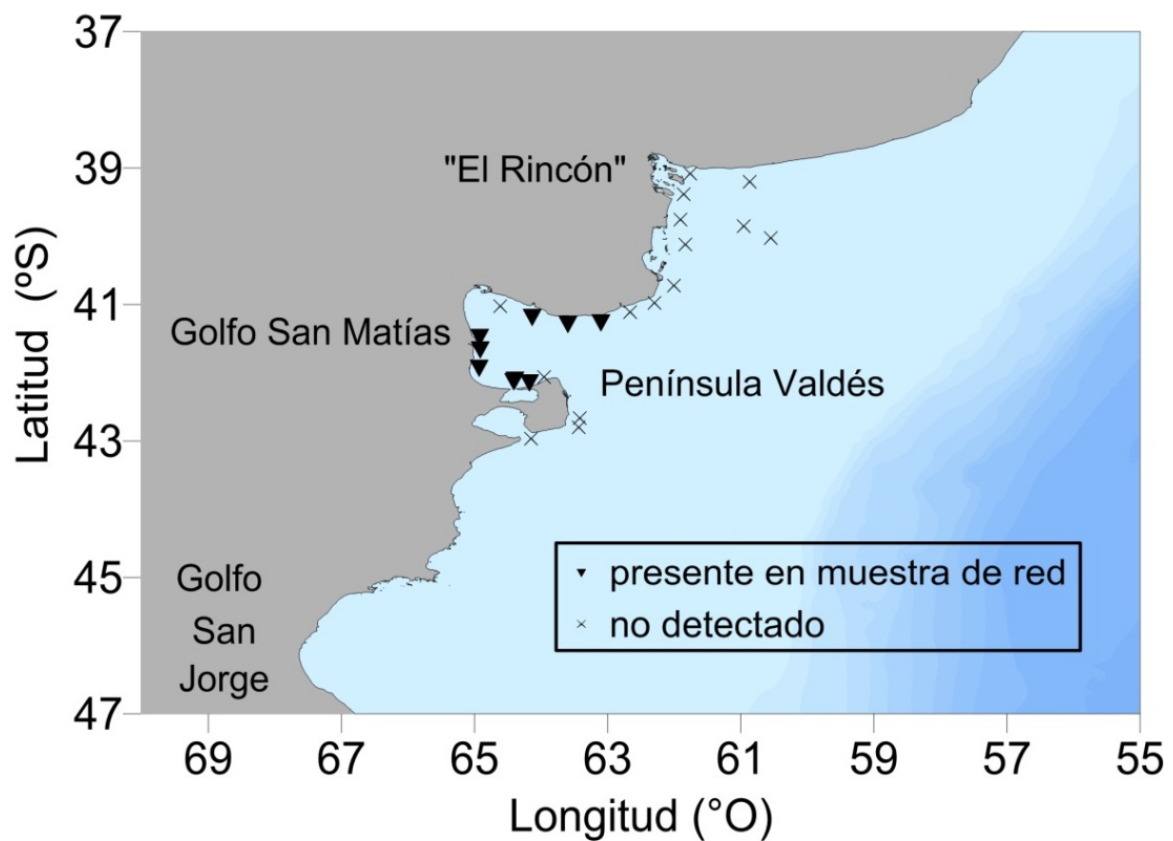


Fig. 6.7: Distribución de *Gonyaulax spinifera* en muestras de red durante la C2.

6.3.3 Campaña de primavera (C3)

Distribución y abundancia

La especie *Protoceratium reticulatum* estuvo presente en tres muestras de botella ubicadas al norte del Golfo San Jorge y en aguas de plataforma cercanas al talud a los $\sim 44^\circ\text{S}$ en abundancias de 20 a 660 cél. L^{-1} y representó entre el 0,1 y 4,5 % de la abundancia total de los dinoflagelados (promedio= 1,6 %). Adicionalmente, se encontró en cinco muestras de red correspondientes al Golfo San Jorge y aguas del talud a los ~ 39 y 44°S (Fig. 6.8 A).

Se detectaron representantes del complejo *G. spinifera* en seis muestras cuantitativas correspondientes al Golfo San Jorge y a aguas del talud a los ~ 39 y 44°S . Las densidades celulares alcanzadas variaron entre 20 y 140 cél. L^{-1} y representaron entre el 0,03 y 1,3 % de la abundancia total de los dinoflagelados (promedio= 0,3 %). Además se encontraron células del complejo en 11 muestras de red obtenidas en aguas del talud, en el Golfo San Jorge y en aguas adyacentes a Península Valdés (Fig. 6.8 B).

El rango de temperatura en que se encontraron células de *P. reticulatum* fue de 10 a 12°C y la salinidad de 33,1 a 33,7, con densidades celulares máximas a 12°C y 33,4. *G. spinifera* se encontró a temperaturas entre 7 y 12°C y a salinidades entre 33,4 y 33,9. Presentó las densidades celulares máximas a 8°C y a una salinidad de 33,9.

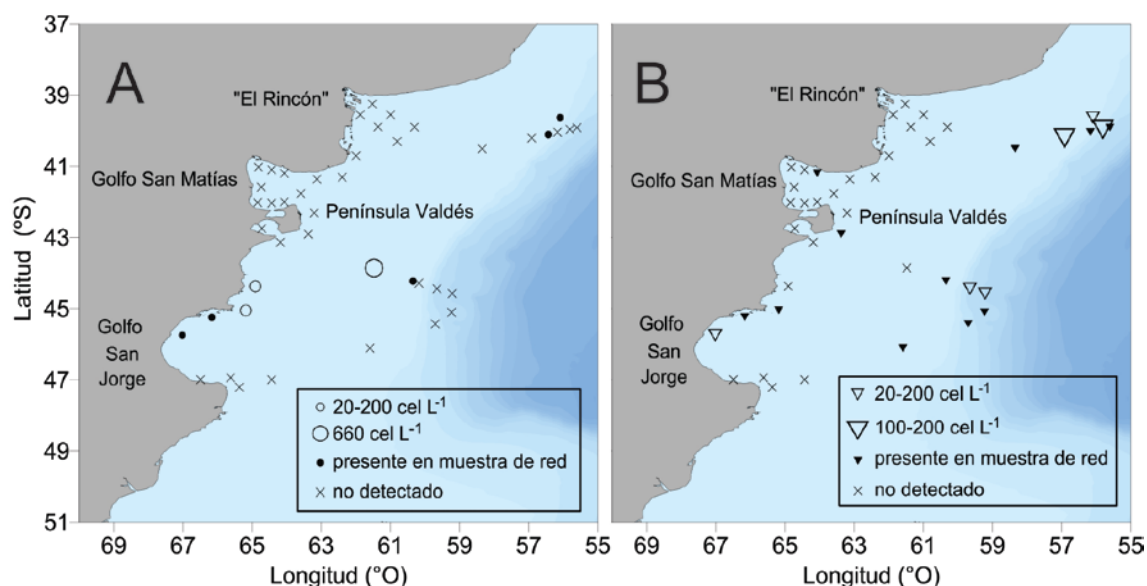


Fig. 6.8: Distribución y abundancia en muestras de botella y presencia en muestras de red de *Protoceratium reticulatum* (A) y *Gonyaulax spinifera* (B) durante la C3.

Toxinas asociadas

La presencia de YTX se detectó en cuatro estaciones correspondientes a la fracción de 20-50 μm ubicadas en aguas del talud y de plataforma a los 44 °S y en el Golfo San Jorge. Las concentraciones halladas variaron entre 14 y 283 ng LR^{-1} . Además se detectó YTX en la fracción de 50-200 μm de la estación 45, correspondiente a aguas de plataforma cercanas al talud a los 44 °S, en una concentración de 88 ng LR^{-1} . *P. reticulatum* estuvo presente en todas las muestras en las que se detectaron YTX (Fig. 6.9), tanto en las cuatro correspondientes a la fracción de 20-50 μm como en la de la fracción de 50-200 μm y además en cuatro muestras de la fracción menor y en seis de la fracción mayor en las cuales no se detectaron YTX, aunque las abundancias alcanzadas en dichas estaciones fueron bajas ($< 2 \text{ cél.} \times 10^3 \text{ LR}^{-1}$).

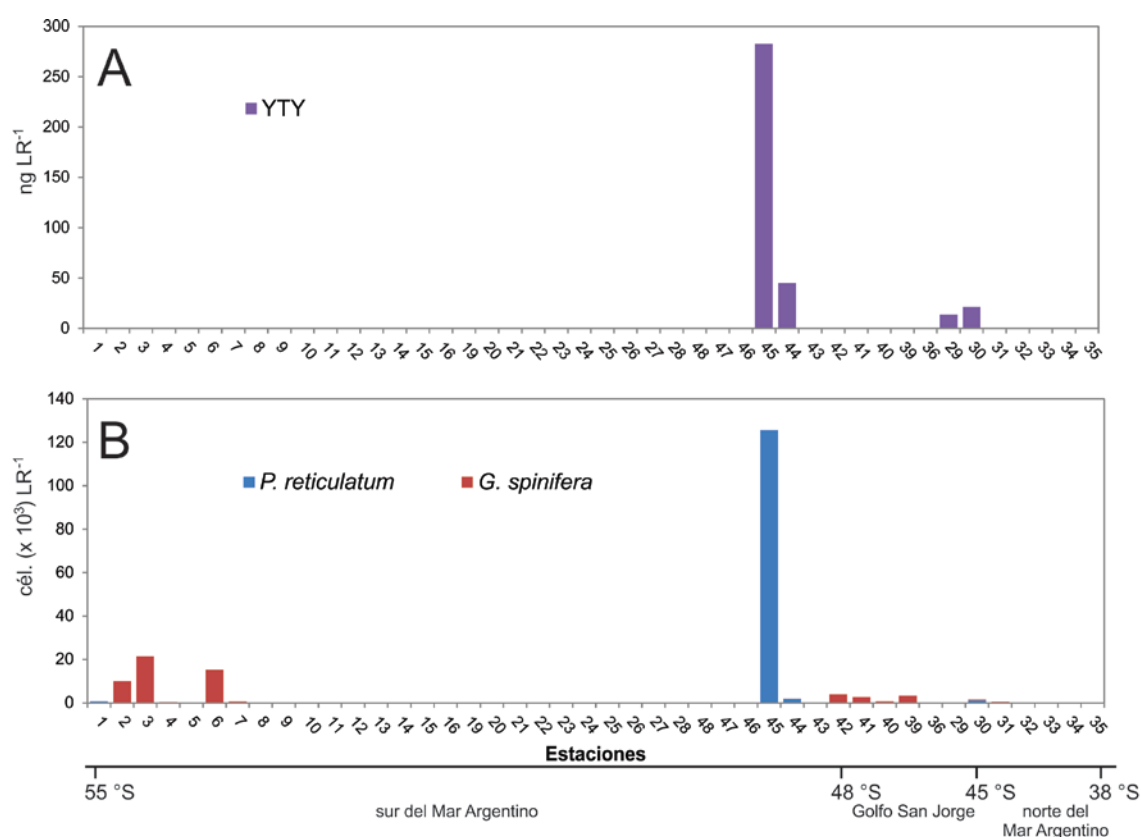


Fig. 6.9: Concentración de YTX (A) y abundancia de células de *P. reticulatum* y *G. spinifera* (B) en la fracción de 20-50 μm de muestras de red a lo largo de la C3.

Los valores de abundancia celular de *P. reticulatum* y concentración de YTX presentaron una correlación significativa en ambas fracciones ($r= 0,73$ y $0,4$). Las cuotas celulares de YTX estimadas para *P. reticulatum* en la fracción de 20-50 μm y de 50-200 μm fueron de 2,2 y 6,5 pg cél.^{-1} respectivamente.

Se encontraron células correspondientes al complejo *G. spinifera* en tres de las cuatro muestras en las que se detectaron toxinas en la fracción de 20-50 μm , aunque siempre en abundancias inferiores a *P. reticulatum*. La correlación entre densidad celular de *G. spinifera* y YTX resultó baja y no significativa ($r=0,17$).

6.3.4 Campaña de verano (C4)

Distribución y abundancia

P. reticulatum no se detectó en muestras de botella ni de red, mientras que el complejo *G. spinifera* se observó solo en dos muestras de red correspondientes al sur del Mar Argentino (55 °S), en densidades de 9 y 12 $\times 10^3$ cél. LR⁻¹ (Fig. 6.10).

El rango de temperatura en que se encontraron células del complejo *G. spinifera* fue de 5 a 8 °C y la salinidad de 33,5 a 34.

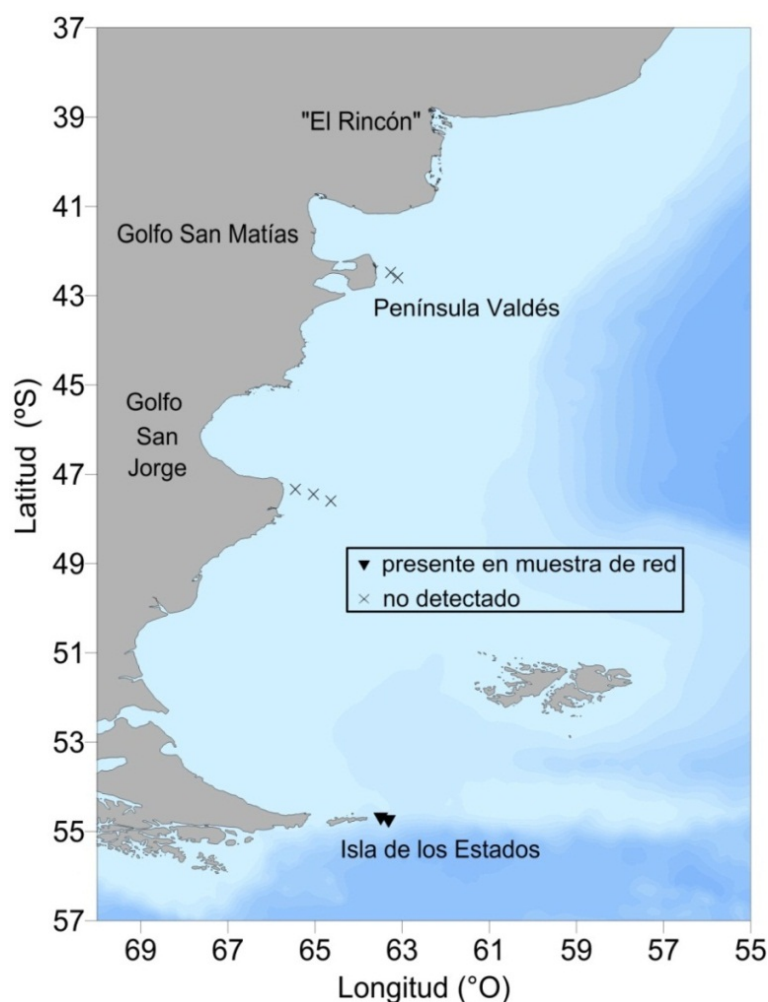


Fig. 6.10: Distribución del complejo *Gonyaulax spinifera* en muestras de red durante la C4.

Toxinas asociadas

No se detectaron YTX durante esta campaña

6.4 Discusión y Conclusiones

Durante este estudio se detectaron dos especies potencialmente productoras de YTX, *Protoceratium reticulatum* y *Gonyaulax spinifera*. Por el contrario, la especie *Lingulodinium polyedrum*, también considerada como productora de YTX, no se observó en ninguna de las cuatro campañas realizadas.

P. reticulatum se observó desde los ~39 °S a los ~47 °S, tanto en aguas de plataforma como del talud, donde se detectaron las abundancias máximas. Este patrón de distribución se asemeja al mencionado en los registros históricos de la especie desde los 37 a los 47 °S (Balech, 1988), aunque Akselman et al. (2015) la hallaron también más al sur, a los ~49 y 53 °S. Por otro lado, el complejo *G. spinifera* presentó una distribución más amplia, desde los 39 °S a los 55°S, lo cual concuerda con la distribución citada en la literatura, desde los 37 °S hasta la convergencia antártica (Balech, 1988).

Las densidades celulares detectadas durante este estudio para ambos taxones fueron bajas, con máximos durante la campaña de primavera de sólo 660 y 140 cél. L⁻¹ para *P. reticulatum* y el complejo *G. spinifera*, respectivamente. Ambos se hallaron en mayores concentraciones durante las campañas de otoño y primavera en comparación con las de verano y verano tardío, en las cuales solo se detectó al complejo *G. spinifera* en muestras de red. En cuanto a la relación con las variables ambientales disponibles, éste último se observó a rangos de temperatura y salinidad más amplios que *P. reticulatum* (5-16 °C; 32,2-34 y 10-14 °C; 33,1-33,7 respectivamente). Aunque ambas especies fueron consideradas de aguas frías por Balech (1988), experimentos realizados con *P. reticulatum* hallaron la mayor tasa de división celular a los 20 °C y la mínima a los 10 °C (Houghton et al., 2016), de manera que las bajas densidades encontradas en este estudio podrían relacionarse con las temperaturas registradas durante las cuatro campañas realizadas, las cuales fueron siempre inferiores a los 19 °C, con una temperatura promedio de 12,6 °C. Asimismo durante una floración de *P. reticulatum* al norte de Chile se observaron masas de agua cálidas (21 a 25°C) mezcladas con masas de agua provenientes de un intenso upwelling (Álvarez et al., 2011).

Si bien *P. reticulatum* y *G. spinifera* pertenecen a géneros diferentes, son muy cercanas entre sí, con una estructura fina muy similar y semejanzas a nivel ultraestructural de las organelas (plástidos, pirenoide y sistema pusular) (Hansen et al.,

1996/1997). Sin embargo, la diferenciación morfológica puede realizarse mediante microscopía óptica en base a caracteres de la forma general de la célula, como la posición del cingulum, la areolación y la presencia/ausencia de espinas antapicales (Balech, 1988).

Los ejemplares de *P. reticulatum* analizados en este estudio presentaron las características típicas de la especie según su descripción clásica (Balech 1988, = *Gonyaulax grindleyi*), aunque el tamaño de las células (largo: 39-55,5 µm; ancho: 33-48 µm) fue levemente mayor al descrito por Balech (1988) para especímenes del Mar Argentino (largo: 35-45 µm, ancho: 28-37 µm) y por Akselman et al. (2015) para el Golfo San Jorge (largo: 34–39 µm, ancho: 29–31 µm). En este sentido, Paz et al. (2013) encontraron una variación significativa en el biovolumen de distintas cepas de *P. reticulatum* aisladas de España.

Los especímenes analizados durante este estudio presentaron en la epiteca tres placas apicales y una intercalar, lo cual concuerda con las observaciones previas de Akselman et al. (2015) para las poblaciones de Argentina. Por el contrario, las poblaciones naturales de *P. reticulatum* analizadas en un sitio cercano a su localidad tipo (Strib, Dinamarca) presentaron un 50% de especímenes con una placa intercalar y el otro 50% sin placas intercalares (Hansen et al. 1996/1997), con la consecuente variabilidad en el patrón de placas de la especie (3', 1a, 6'', 6c, s, 6''', 2'''' ó 4', 0a, 6'', 6c, s, 6''', 2''''). Asimismo, cultivos aislados del mismo sitio presentaron una división de la placa intercalar en tres placas, indicando un grado de variabilidad adicional en la fórmula epitecal de la especie.

Los ejemplares del complejo *G. spinifera* analizados en este estudio también presentaron las características típicas halladas en la literatura, como un contorno particular dado por un prominente cuello y dos espinas antapicales, una fuerte areolación y un marcado desplazamiento y entrecruzamiento cingular (Balech, 1988). Según su morfología los especímenes más pequeños con dos espinas y una reticulación suave corresponden a la especie *G. spinifera*, mientras que las células con más de dos espinas antapicales, con una reticulación marcada y de mayor tamaño corresponden a *G. digitalis* (Balech, 1988; Ellegaard et al., 2003). Sin embargo, varios autores han mencionado que la identificación microscópica de especies dentro del complejo *G. spinifera* resulta difícil y incierta (Dodge, 1989; Tomas, 1997; Lewis et al., 1999; Ellegaard et al., 2003), y que las diferencias morfológicas entre los quistes parecen representar mejor las diferencias genéticas entre las especies que las características

morfológicas de la fase vegetativa (Ellegaard et al., 2003). Por otro lado, la variabilidad molecular del complejo podría implicar la presencia de especies crípticas ya que existen cepas de *G. spinifera* que no forman un grupo monofilético sino que poseen mayor cercanía filogenética con otras especies de morfología similar, como *G. digitalis*. No obstante, las pocas secuencias disponibles para este complejo de especies dificulta la determinación fehaciente a nivel específico desde el punto de vista molecular (Riccardi et al., 2009). En este contexto y dada la incertidumbre que actualmente existe sobre la identidad de las especies del complejo *G. spinifera* (Riccardi et al., 2009), en este estudio se optó por considerar a los ejemplares definidos en base a su morfología como *G. spinifera* y *G. digitalis* como integrantes del complejo de especies *G. spinifera*.

A menudo, cuando una misma toxina es sintetizada por más de una especie, resulta complejo identificar en el campo al organismo responsable de dicha toxicidad. Tal es el caso de la producción de YTX, debido a la reciente confirmación de nuevas especies productoras. Particularmente en el Mar Argentino existe un único estudio abocado a la determinación de YTX y especies productoras en el Golfo San Jorge (Akselman et al., 2015), por lo cual aún no se posee un conocimiento fehaciente sobre los roles de las dos especies toxigénicas citadas para la región (*P. reticulatum* y *G. spinifera*). Sin embargo, los resultados presentados en este trabajo sustentan la asociación entre *P. reticulatum* y YTX en el Mar Argentino, ya que durante las C1 y C3 la detección de YTX presentó una clara asociación con la presencia de la mencionada especie. Por el contrario, el complejo *G. spinifera* estuvo presente en muestras de red en abundancias moderadas, durante las C2 y C4 en las que no se detectaron YTX, y mostró una asociación más débil que *P. reticulatum* durante las C1 y C3. Esto sugiere que el aporte del complejo *G. spinifera* a la producción de YTX en el Mar Argentino no parece ser de gran peso. En este sentido, los únicos dos cultivos de *G. spinifera* para los cuales se ha comprobado fehacientemente la producción de YTX a nivel mundial (utilizando LC-MS), mostraron diferentes perfiles tóxicos. Uno presentó bajas cuotas celulares (5,4 pg cél.⁻¹) y dominancia de YTX (como en *P. reticulatum*), mientras que el otro presentó cuotas celulares más altas (33,4 pg cél.⁻¹) y dominancia de homo-YTX (Riccardi et al., 2009). No obstante, el análogo homo-YTX típico de *G. spinifera* no se detectó en el presente estudio durante ninguna de las cuatro campañas de muestreo realizadas y tampoco existen antecedentes de análisis de toxicidad en cultivo para cepas argentinas. Por otro lado, *Lingulodinium polyedrum*, la tercera especie considerada productora de YTX, no se observó durante este estudio. *L. polyedrum* suele formar floraciones en

zonas de aguas templado-cálidas como en la costa de Baja California, México y en Costa Rica (Peña-Manjarrez et al., 2009; Morales-Ramírez et al., 2001), mostrando temperaturas óptimas de crecimiento en cultivo alrededor de los 24 °C (Figueroa & Bravo, 2005). Además presenta una fuerte estacionalidad en la germinación de los quistes de reposo asociada con la temperatura superficial del agua (Peña-Manjarrez et al. 2009), produciéndose generalmente a temperaturas entre 17 y 22.5 °C. Considerando las temperaturas medias del Mar Argentino (~13 °C) (Rivas, 1994), la ausencia de células vegetativas de *L. polyedrum* en el Golfo San Jorge, a pesar de la presencia de sus quistes (Akselman et al., 2015), podría deberse a que las temperaturas óptimas para su germinación no son alcanzadas.

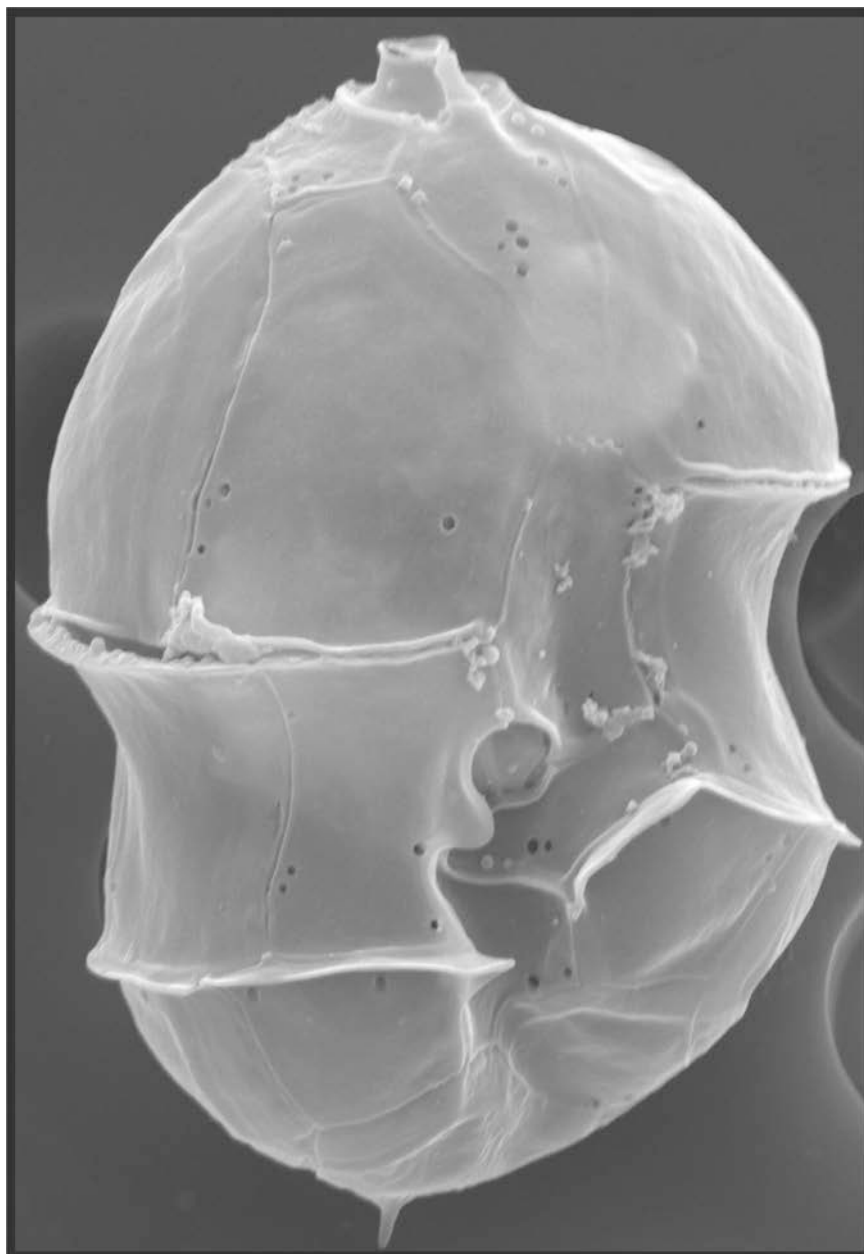
Debido a las bajas abundancias de *P. reticulatum* detectadas en las muestras de red, únicamente se pudieron estimar cuotas celulares de YTX en dos muestras de la C1 y en otras dos de la C3. Las cuotas celulares obtenidas fueron de 2,2 y 12,5 pg YTX cél.⁻¹, y resultaron ser similares a las encontradas para las cepas aisladas del Golfo San Jorge, las cuales presentaron cuotas de 9,1 a 10,2 pg YTX cél.⁻¹ (Akselman et al., 2015) y de 3 a 7 pg YTX cél.⁻¹ (Houghton et al., 2016). Por el contrario, durante una floración de *P. reticulatum* en Bahía Mejillones, Chile, las cuotas celulares de YXT fueron considerablemente menores (0.2 y 0.4 pg cel.⁻¹), aunque los autores mencionan una posible subestimación en el contenido de toxina dada por la preservación de las muestras con formaldehído (Álvarez et al., 2011). En cualquier caso, la producción de YTX, e incluso los perfiles tóxicos, suelen variar dependiendo del origen de las cepas, e incluso las cuotas celulares en cepas de la misma región suelen presentar una gran variación (ej., 2,9-28,6 pg YTX cél.⁻¹ para cuatro cepas de España) (Paz et al., 2007).

El perfil de toxina asociado a *P. reticulatum* en este estudio estuvo representado únicamente por YTX, coincidente con el perfil hallado en Chile y el Golfo San Jorge, (Krock et al., 2009a; Álvarez et al., 2011, Akselman et al., 2015). Este parece ser el perfil típico de *P. reticulatum* (Paz et al., 2007), aunque se han encontrado excepciones en las que también se detectó la dominancia del análogo homoYTX en cultivos obtenidos de España (Paz et al., 2007) y 1-homoYTX en cultivos obtenidos de Japón (Suzuki et al., 2007). Asimismo, cabe destacar la presencia de cepas no toxigénicas aisladas de USA (Paz et al., 2007), Nueva Zelanda (Rhodes et al., 2006) y Japón (Satake et al., 1999; Suzuki et al., 2007).

En síntesis, los datos obtenidos a partir de este estudio sugieren que la especie *P. reticulatum* es la principal productora de YTX en el Mar Argentino, mientras que *G.*

spinifera representa un productor potencial en la región que hasta el momento no ha mostrado una asociación clara con la detección de YTX. El área de registro de YTX en muestras de plancton, hasta el momento acotada al Golfo San Jorge (Akselman et al., 2015), se amplió a áreas de la plataforma externa cercanas al talud continental (~44 °S). No obstante, las mayores concentraciones de YTX y *P. reticulatum* se observaron en el Golfo San Jorge, lo cual representa un llamado de atención sobre el desarrollo de futuros eventos tóxicos vinculados a esta especie en la zona.

Capítulo 7: Especies de Azadinium y toxinas asociadas



7.1 Introducción

El género *Azadinium* Tillmann se describió recientemente a partir de cultivos celulares provenientes del Mar del Norte, siendo *A. spinosum* su especie tipo (Tillmann et al., 2009). Análisis morfológicos y moleculares ubicaron a *Azadinium* dentro de la subclase *Peridiniphyceae* y de la familia *Amphidomataceae*. Sin embargo, su posición filogenética es aún dudosa (Krock et al., 2009b) ya que presenta características morfológicas tanto del orden *Peridinales* como de *Gonyaulacales* (Tillmann et al., 2009).

Las células de *Azadinium* son generalmente de muy pequeño tamaño (~7-13 µm), por lo cual su identificación requiere de la determinación de la fórmula tabular (APC, 4', 3a, 6'', 6C, 5?S, 6''', 2''') (Fig. 7.1) mediante del uso de microscopia electrónica. Sumado a esto, el género *Azadinium* presenta un tamaño y forma muy similares al de algunas especies de los géneros *Amphidoma* y *Heterocapsa*, por lo cual para poder diferenciarlo fehacientemente de estos últimos es necesario observar la cantidad de placas apicales (*Amphidoma* posee seis y *Azadinium* cuatro), intercalares (*Amphidoma* no posee y *Azadinium* sí) (Tillmann et al., 2012a) y pre- y postcingulares (*Azadinium* posee seis en ambos casos y *Heterocapsa* siete y cinco, respectivamente) (Tillmann et al., 2014). Asimismo, el análisis de las características morfológicas utilizadas en la diferenciación de especies dentro del género, tales como la presencia o ausencia de una espina antapical, la estructura del complejo del poro apical, la ubicación del poro ventral y características específicas de algunas placas (ej. 2a), también requieren la utilización de microscopía electrónica (Tillmann et al., 2009, 2010, 2012a, b).

La familia *Amphidomataceae* ha cobrado gran importancia en los últimos años por abarcar especies, tanto del género *Azadinium* como *Amphidoma*, capaces de sintetizar azaspirácidos (AZAs). Este grupo de toxinas lipofílicas es capaz de acumularse en organismos del plancton y en bivalvos y generar intoxicaciones en humanos provocando síntomas coincidentes con el síndrome diarreico de moluscos (SDM) (McMahon & Silke, 1996). Los AZAs fueron caracterizados como aminas cíclicas (Fig. 7.2) a partir de muestras de moluscos provenientes de Irlanda en los años '90 (Satake et al., 1998), tras haber sido causantes de la intoxicación de ocho personas en Holanda. Hasta la descripción del género *Azadinium* en 2009 se creía que el

organismo productor de AZAs era el dinoflagelado heterótrofo *Protoperidinium crassipes* (Yasumoto, 2001; James et al., 2003a,b). Sin embargo, la producción de AZAs por parte de *P. crassipes* no había podido ser verificada, a pesar de realizarse análisis exhaustivos tanto de campo como de cultivo. Luego de la detección de grandes cantidades de AZAs en la fracción menor (8–20 μm) de muestras de plancton colectadas en el Mar del Norte (Krock et al., 2008b) se realizaron cultivos de dinoflagelados de dicha fracción de tamaño con el fin de encontrar al productor *de novo* de estas toxinas, ya que por su mayor tamaño *P. crassipes* (70–80 μm) quedaba descartado como tal. Este trabajo dio como resultado la detección de un dinoflagelado tecado de pequeño tamaño y desconocido hasta el momento (*A. spinosum* gen et sp. nov.) como productor de AZAs (Krock et al., 2009b; Tillmann et al., 2009). Actualmente *Azadinium* consta de 12 especies (Tillmann et al., 2014, Tillmann & Akselman, 2016; Luo et al., 2017), tres de las cuales (*A. spinosum*, *A. dexteroporum* y *A. poporum*) han mostrado la capacidad de sintetizar AZAs (Tillmann et al., 2009; Krock et al. 2012; Percopo et al., 2013). Adicionalmente, la producción de AZAs ha sido comprobada en *Amphidoma languida* (Krock et al., 2012).

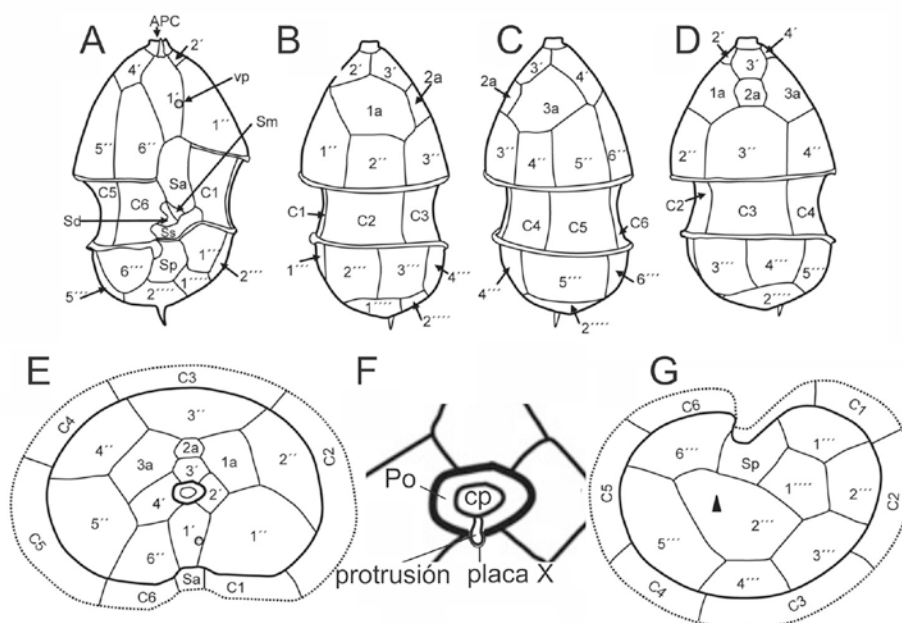


Fig. 7.1: Esquemas de *Azadinium spinosum*, especie tipo del género. A) vista ventral. B) vista lateral izquierda. C) vista lateral derecha. D) vista dorsal. E) vista apical. F) detalle de APC. G) vista antapical. Abreviaciones: vp: poro ventral. Sa: sulcal anterior. Sp: sulcal posterior. Ss: sulcal izquierda. Sd: sulcal derecha. Sm: sulcal media. APC: complejo del poro apical. Po: placa del poro apical. cp: placa cobertora. (modificado de Fig. 6 de Tillmann et al., 2009).

La distribución del género *Azadinium* abarca el Mar del Norte, los sectores noreste y suroeste del océano Atlántico, el Pacífico mejicano y asiático y el Mar Mediterráneo (Akselman & Negri, 2012; Tillmann et al., 2014 y referencias incluidas). Tanto la amplia distribución de representantes de la familia *Amphidomataceae* como de análogos de AZAs asociados a las especies (James et al. 2003a,b; Braña Magdalena et al. 2003; Taleb et al. 2006; López-Rivera et al. 2009; Yao et al., 2010) indican una distribución cosmopolita del género.

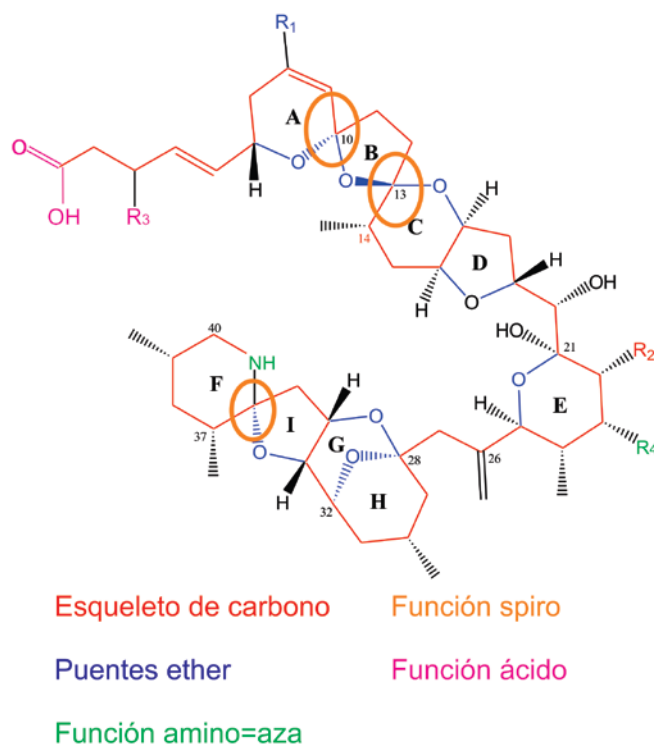


Fig. 7.2: Fórmula química de los azaspirácidos (AZA) detallando las funciones químicas que posee la molécula.

Los primeros registros de floraciones del género *Azadinium* en el Mar Argentino corresponden a los años 1990 y 1991, ambos durante la primavera y en aguas abiertas de plataforma y del talud frente a la Provincia de Buenos Aires (Akselman & Negri, 2012). La primera floración generó una discoloración del agua que prevaleció por una semana aproximadamente, abarcando un área de 60 km² (~40°21' S-59°52' W). La presencia de una espina antapical y de un pirenoide en las células analizadas llevó a los autores a definirlas como *Azadinium* cf. *spinosum*, una de las tres especies del género descritas hasta ese momento. Sin embargo, algunas características taxonómicas importantes, como la ubicación del poro ventral, no habían podido ser observadas. Recientemente, la re-examinación con microscopía electrónica de las muestras de la

floración de 1991 llevó a la descripción de una nueva especie, *Azadinium luciferelloides*, la cual se encontraba como especie dominante junto a otras de la familia *Amphidomataceae*, entre ellas *A. spinosum*, *A. dalianense* y *A. dexteroporum* (Tillmann & Akselman, 2016). Por otro lado, el análisis toxinológico de cultivos de la especie *A. poporum* establecidos a partir de la germinación de quistes provenientes de muestras de sedimento de la región de “El Rincón” mostraron un perfil dominado por AZA-2 en las 10 cepas monoclonales analizadas (Tillmann et al., 2016b). Asimismo, cantidades no cuantificables de AZA-2 fueron detectadas a partir de bivalvos colectados en Santa Teresita y San Clemente del Tuyú, Provincia de Buenos Aires (Turner & Goya, 2015).

A pesar de los antecedentes recientes que indican la presencia de especies de *Azadinium* y AZAs de manera puntual en la región, es poco lo que aún se sabe sobre la diversidad, ocurrencia y toxicidad del género *Azadinium* a lo largo del Mar Argentino. Si bien la identificación y cuantificación inequívoca de las especies toxígenas dentro de la familia *Amphidomataceae* y su diferenciación respecto de especies no productoras de AZA es desafiante, especialmente porque tanto especies toxígenas como no toxígenas suelen coexistir en la misma masa de agua (Tillmann et al., 2010, 2011, 2012b), esta es una tarea de vital importancia para conocer a los principales responsables de la producción de AZA en condiciones naturales. Considerando la reciente descripción de nuevas especies de la familia *Amphidomataceae* y el descubrimiento de nuevos análogos de AZA a nivel mundial (Krock et al., 2012; Tillmann et al., 2014, 2017; Rossi et al., 2017), es de esperar que existan especies aún no descritas de la familia, las cuales podrían incluir una fuente primaria de AZA no registrada. A su vez la presencia de especies aún no conocidas en muestras de plancton podrían producir falsos positivos durante los relevamientos realizados con las sondas moleculares diseñadas para las especies toxigénicas conocidas hasta el momento (*A. spinosum*, *A. dexteroporum* y *A. poporum*) (Tillmann et al., 2009; Gu et al., 2012; Percopo et al., 2012). Por lo tanto, es necesario obtener más información sobre la diversidad de especies de la familia *Amphidomataceae*, sobre sus características moleculares y morfológicas y sobre su distribución geográfica. En el presente capítulo se presentan los resultados del análisis morfológico, de distribución y de abundancia de las especies del género *Azadinium* y su relación con la detección de AZAs durante las cuatro campañas de muestreo.

7.2 Descripción morfológica de las especies encontradas

Azadinium dexteroporum Percopo

(Fig. 7.3)

Percopo et al. (2013)

Células elipsoidales de pequeño tamaño. La epiteca (2,6-3,9 μm) es cónica, una vez y media a tres veces más alta que la hipoteca (1,4-2,3 μm) y posee un conspicuo APC. Epiteca un tanto más ancha que la hipoteca. La hipoteca es algo asimétrica y posee una espina antapical en la placa 2''' (Fig. 7.3 A). Cingulum descendente, muy excavado y ancho (0,8-1,8 μm), representa aproximadamente un cuarto del largo de la célula. Las aletas cingulares son muy angostas, se encuentran formadas por la región posterior de las placas precingulares y la región anterior de las placas postcingulares. Po es asimétrica y posee un vp en la región derecha (Fig. 7.3 B). El poro apical es circular y se ubica en el centro de la placa Po, cubierto por la placa cobertora (cp). La placa 1' es asimétrica en su región anterior y el extremo posterior es muy angosto. Las placas intercalares 1a y 3a contactan con seis placas y son de tamaño similar, mientras que la placa 2a es levemente más pequeña y cóncava, forma una depresión respecto de las placas adyacentes y se encuentra rodeada por cuatro placas: 3', 1a, 3a y 3'' (Fig. 7.3 C, D). La teca es tersa y lisa aunque posee grupos de poros en regiones determinadas, entre las cuales son características la región media de las placas 1a y 3a (Fig. 7.3 D). Dimensiones: largo 6,1 a 7,3 μm , ancho 5 a 5,9 μm ($n=6$).

Azadinium luciferelloides Tillmann & Akselman

(Fig. 7.4)

Tillmann & Akselman (2016)

Células pequeñas de forma general ovoide. Epiteca (3,3-6,3 μm) cónica, más alta que la hipoteca (1,6-4,8 μm), representa un tercio de la longitud total de la célula y posee un conspicuo APC. Cingulum amplio (1,7-3,1) y descendente, aproximadamente la mitad de su ancho. Epiteca un tanto más ancha que la hipoteca. El poro apical se encuentra en Po cubierto por la cp y contacta hacia la región ventral con las placas X y 1' por medio de una protrusión en forma de dedo. El pv se ubica en la región derecha de Po y contacta con las placas 1' y 4'. Placa 1' romboidal y apenas asimétrica en la región anterior.

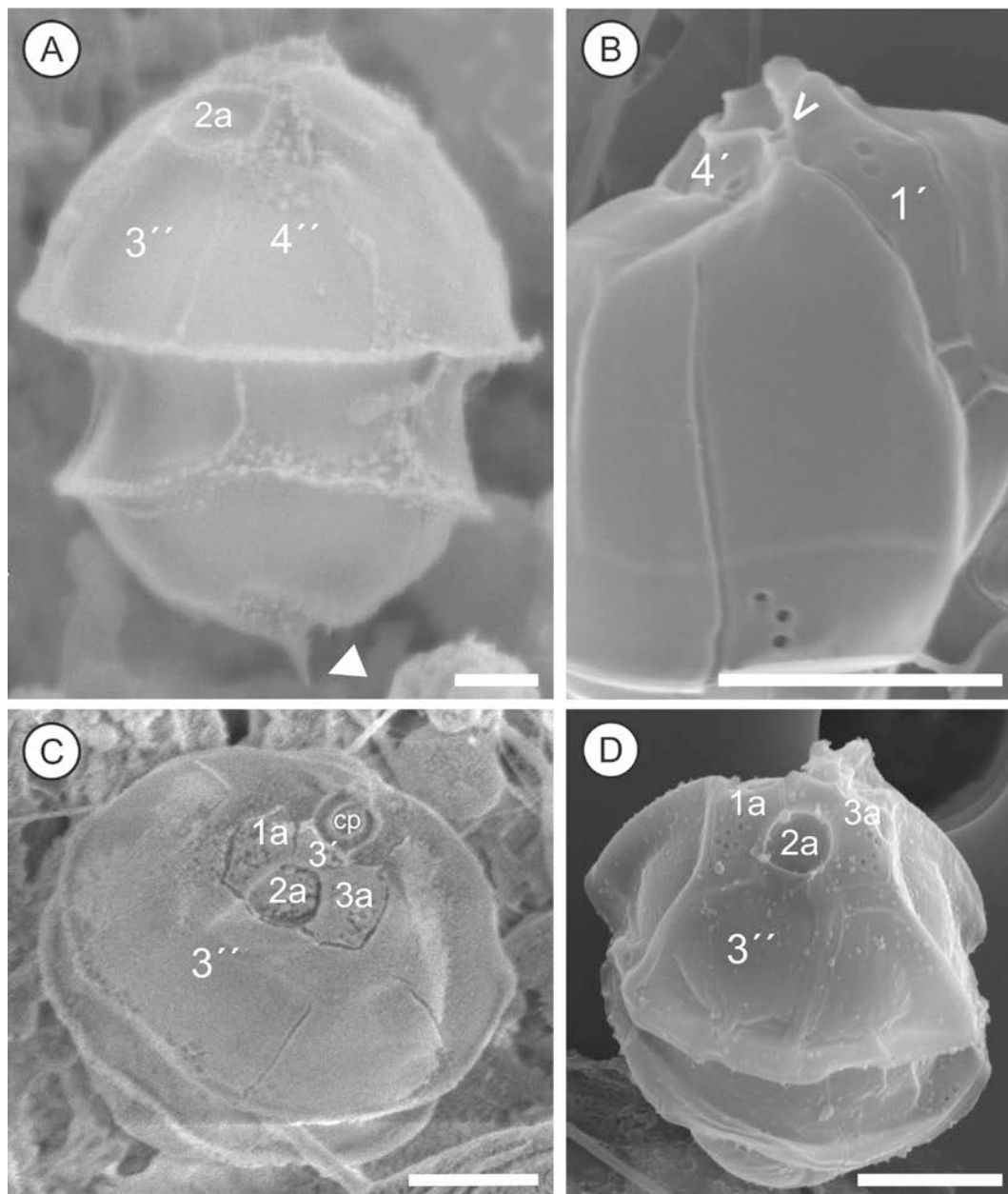


Fig. 7.3: Fotografías de *A. dexteroporum* tomadas con microscopía electrónica de barrido. A) Vista general latero-dorsal, note la depresión formada por la placa 2a y la presencia de una espina antapical (pirámide). B) Vista ventral, note el extremo posterior angosto de la placa 1' y la ubicación del vp (V) en la región derecha de Po. C), D) Vistas apicales, note la concavidad de la placa 2a y los grupos de poros en las placas 1a y 3a en D. Escala: 2µm

Las placas precingulares son similares en tamaño. La 6'' contacta con tres placas epitecales (1', 4' y 5'') ya que se encuentra separada de la placa intercalar 3a por la placa apical 4' (Fig. 7.4 A). Hipoteca redondeada, placas postcingulares 1''' y 6''' de posición ventral, placa 2''' con una espina antapical (Fig. 7.4 A, C). Placas intercalares 1a y 3a de mayor tamaño que la 2a (Fig. 7.4 B). Sulcus profundo formado por cinco placas. La Sa apenas penetra en la epiteca, mientras que la Sp claramente se extiende hacia la

hipoteca. La placa Ss se ubica antes que la Sp a lo largo de la línea entre las placas cingulares C1 y C6. Entre la Sa, la C6 y la Ss se encuentra una depresión formada por las placas Sm y Sd (Fig. 7.4 E, F).

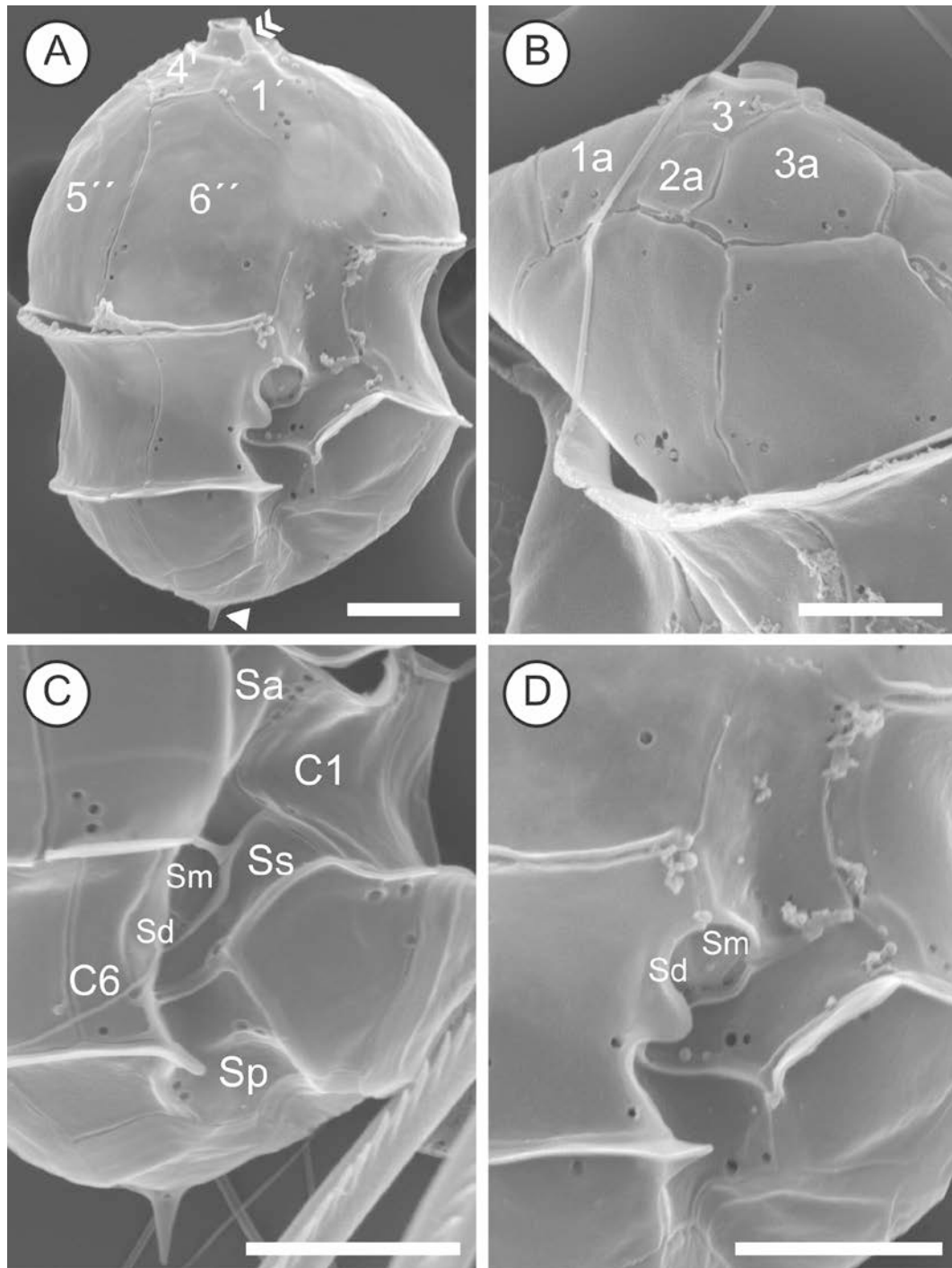


Fig. 7.4: Fotografías de *A. luciferelloides* tomadas con microscopía electrónica de barrido. A) Vista general ventral, note la protrusión en forma de dedo (doble flecha) que contacta cp con 1' y la presencia de una espina antapical (pirámide). B) Vista dorsal de la epiteca, note la ausencia de poros en la placa 2a. C), D) Detalles de la región sulcal, note la ausencia de poros en Sd y Sm. Escala: 2µm.

La teca es suave y lisa pero todas las placas excepto las 2a, Sd y Sm presentan uno o dos grupos de poros característicos de la especie de entre 0,05 y 0,15 μm (promedio 0,1, $n= 27$). Dimensiones: largo 7,4 a 13,6 μm , ancho 4,8 a 10,2 μm ($n= 4$).

***Azadinium obesum* Tillmann**

(Fig. 7.5)

Tillmann et al. (2010)

Células ovoides, placa 1' romboidal y bastante simétrica, aunque la sutura con la placa 1'' es algo mayor que la sutura con la placa 6''; el extremo posterior de 1' es muy angosto. El poro ventral se ubica en la región posterior de la placa 1', en su margen izquierdo (Fig. 7.5 A-D). APC prominente que contacta hacia la región ventral con las placas X y 1' por medio de una protrusión en forma de dedo (Fig. 7.5 C).

Cingulum amplio (2,6-4,5 μm) y descendente la mitad de su ancho, con aletas muy angostas formadas por la región posterior de las placas precingulares y la región anterior de las placas postcingulares. Una extensión de la placa C6 cubre parte de la región sulcal. Sulcus profundo, Sa sobresale levemente hacia la epiteca.

Las placas Sp, Sm, Sd y Ss forman una depresión y poseen pequeñas prolongaciones en las zonas de sutura (excepto entre Sm y Sd). La Sp penetra en la hipoteca aproximadamente dos tercios del largo total de la misma y forma la aleta sulcal derecha, la cual se encuentra doblada levemente hacia la izquierda (Fig. 7.5 C, D).

La teca es tersa y lisa, aunque algunas placas presentan poros dispuestos irregularmente, en general en grupos de dos. Dimensiones: largo 12 a 18,6 μm , ancho 13,5 a 14,9 μm ($n= 4$).

***Azadinium poporum* Tillmann**

(Fig.7.6)

Tillmann et al. (2011)

Células de forma general ovoide, sin espina antapical. APC prominente, la placa Po lleva un vp en la región ventral izquierda, el cual contacta con las placas 1' y 2'. Cingulum profundo y ancho. Presencia de un grupo de cinco a diez poros en la placa 2''', los cuales resultan diagnósticos para ejemplares de la especie en el Mar Argentino. Dimensiones: largo 16,2 μm , ancho 11,4 μm ($n= 1$).

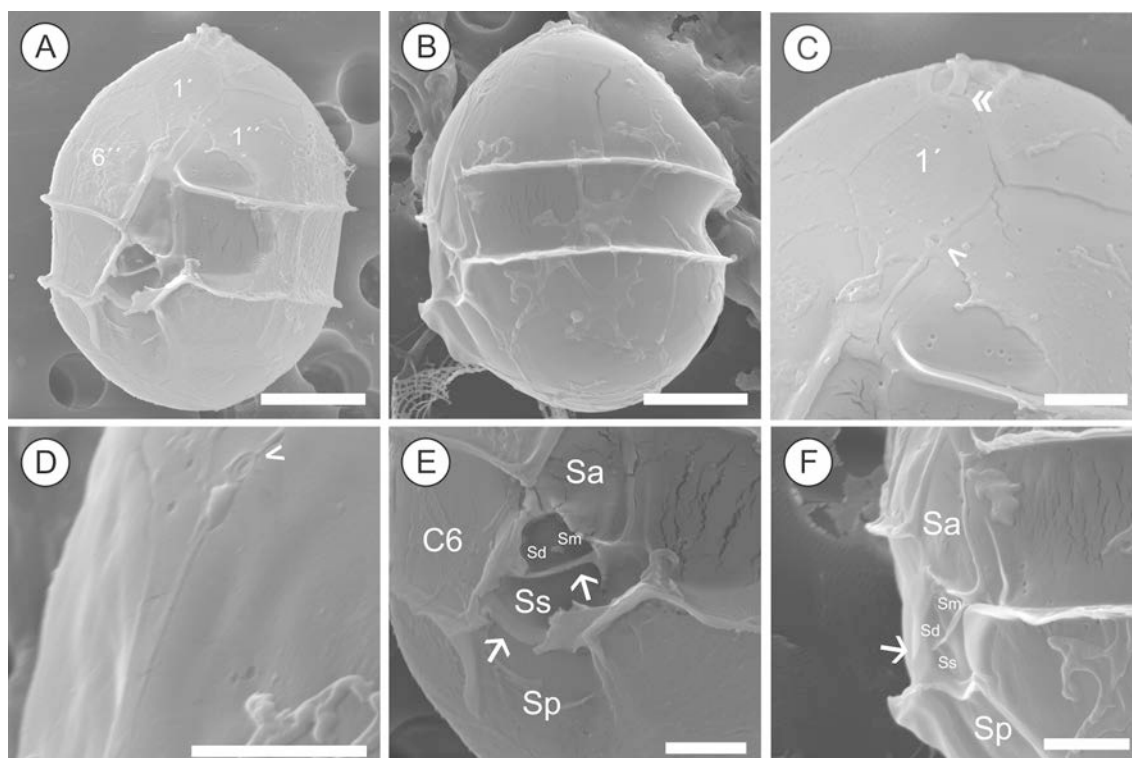


Fig. 7.5: Fotografías de representantes de *A. obesum* tomadas con microscopía electrónica de barrido. A) Vista general ventral, note la forma casi simétrica de la placa 1'. B) Vista general lateral. C) Detalle de A), note la posición de vp (V) y la protrusión en forma de dedo que contacta APC con 1' (doble flecha). D) Detalle de B), note la ubicación de vp (V). E, F) Detalles de la región sulcal, note la depresión formada por las placas Sp, Sm, Sd y Ss y las prolongaciones en forma de aletas en las suturas entre las placas Sp y Ss y entre Ss y Sd (flechas). Escala: A, B): 5µm, C-F): 2µm.

Azadinium sp.

(Fig. 7.7)

Tillmann en preparación (comunicación personal)

Placa 1' romboidal, simétrica ya que las suturas entre esta placa y las placas 2' y 4' son muy similares (Fig. 7.7 A), lleva un poro ventral en la región anterior izquierda, a la altura del final de la sutura con la placa 2' (Fig. 7.7 A-D). Placas intercalares 1a y 3a hexagonales, notoriamente mayores que la 2a, la cual es rectangular y de cuatro lados (Fig. 7.7 A). El poro apical se encuentra cubierto por cp y se ubica en el centro de Po, contacta hacia la región ventral con las placas X y 1' por medio de una protrusión en forma de dedo (Fig. 7.6 7 C). La teca rugosa es una característica distintiva de la especie, además todas las placas de la epiteca, incluyendo la 2a, poseen poros dispersos de manera irregular en toda la superficie de la placa, dispuestos individualmente o en grupos de hasta cinco.

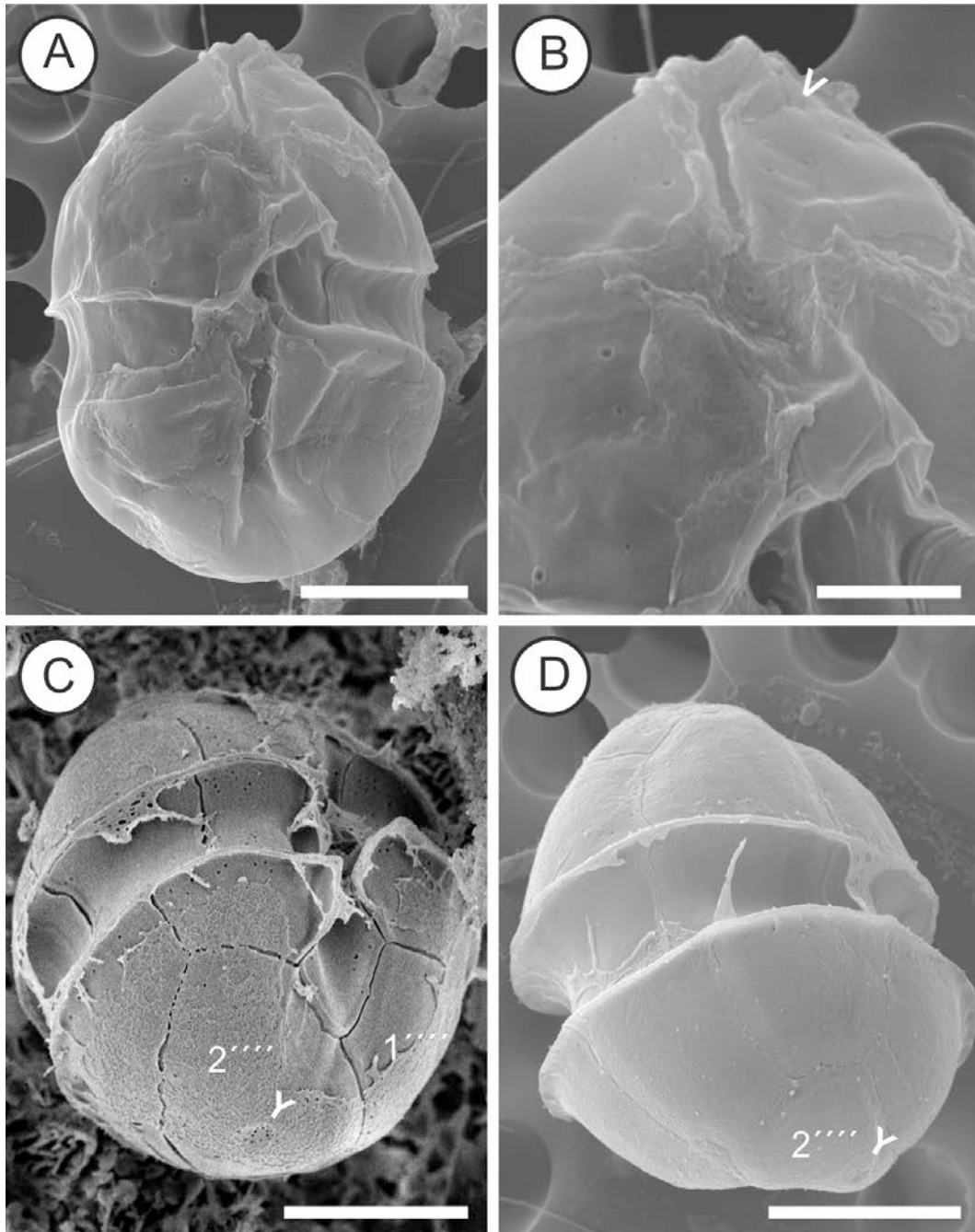


Fig. 7.6: Fotografías de representantes de *A. poporum* tomadas con microscopía electrónica de barrido. A) Vista general ventral. B) Detalle de A), note la ubicación de vp (V) en el margen izquierdo ventral de Po. C) Vista ventro-antapical, note el grupo de poros en la placa 2''' (Y). D) Vista dorso-antapical, note el grupo de poros en la placa 2'''(Y). Escala: A, C, D): 5 μ m. B): 2 μ m.

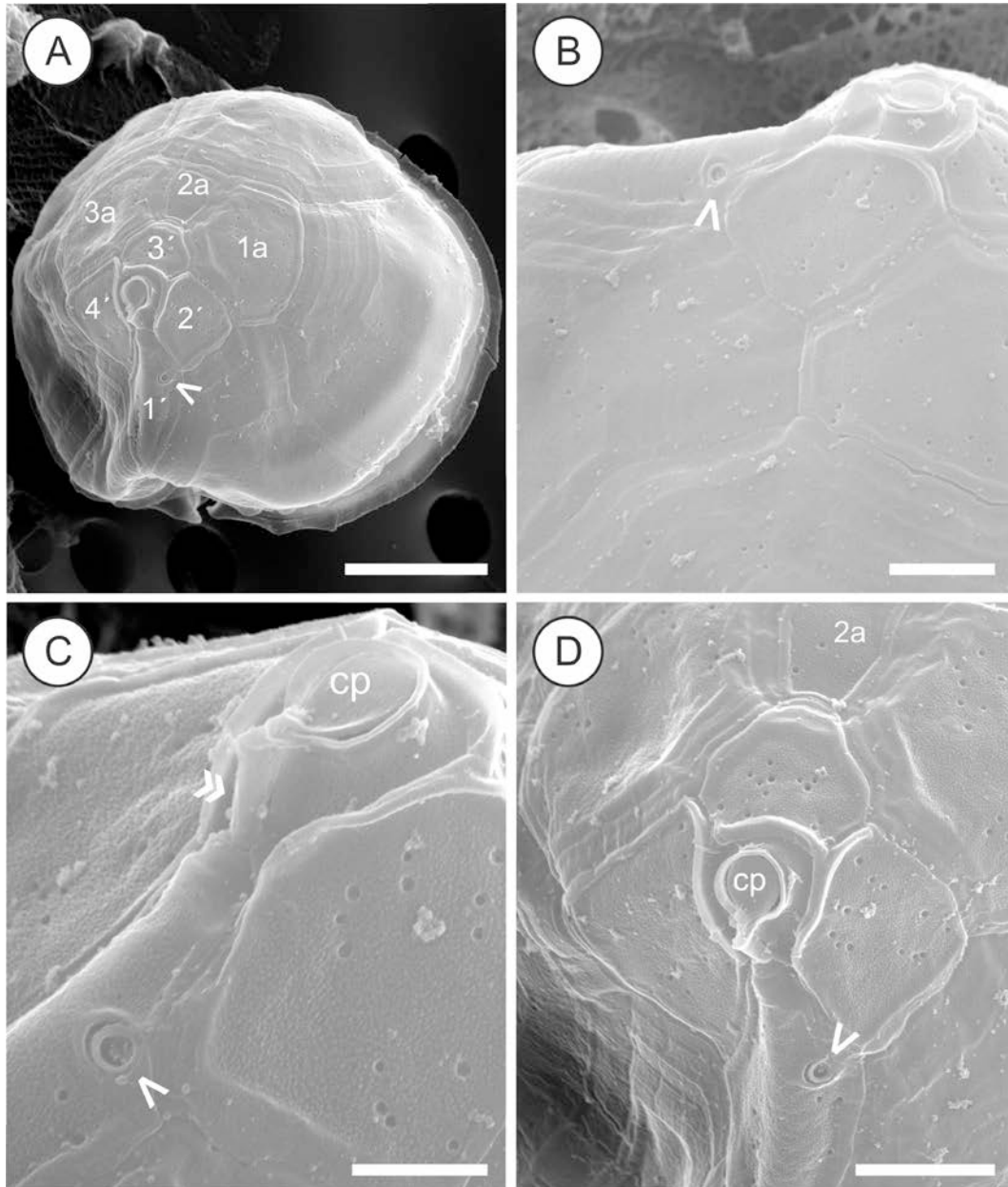


Fig. 7.7: Fotografías de *Azadinium* sp. tomadas con microscopía electrónica de barrido. A) Vista apical, note la ubicación del vp (V) en la región izquierda de la placa 1' a la altura de la sutura entre las placas 1' y 2'. B) Detalle de la epiteca mostrando la ubicación de vp (V). C) Detalle de la epiteca, note la presencia de una protrusión de forma de dedo entre cp y 1' (doble flecha). D) Detalle de la epiteca, note la presencia de poros en todas las placas, incluyendo la 2a. Escala: 2µm.

7.3 Distribución y abundancia del género *Azadinium* y toxinas asociadas

7.3.1 Campaña de otoño (C1)

Distribución y abundancia

El género *Azadinium* se encontró en 15 de un total de 47 muestras de botella, con densidades celulares entre 20 y 4.000 cél. L⁻¹ y representó en esas estaciones entre un 0,4 y un 31 % de la abundancia total de dinoflagelados (promedio= 10 %). Las máximas abundancias se hallaron al sur del área de estudio (55 °S) en aguas de plataforma cercana a la costa de Tierra del Fuego e Isla de los Estados (Fig. 7.8). Mediante análisis con microscopía electrónica de barrido del concentrado de tres muestras de botella correspondientes a las estaciones I9, I13 y I15, obtenidas al sur del área de muestreo (~55°C), se determinó la presencia de dos especies, *A. dexteroporum* y *A. poporum*. En las muestras de red no se encontraron células del género *Azadinium*.

Las células de *Azadinium* detectadas en esta campaña se encontraron en un rango de temperaturas entre 6 y 14 °C y a salinidades entre 31,2 y 34,2.

Toxinas asociadas

No se detectaron azaspirácidos en los filtros correspondientes a las muestras de botella y tampoco en los pellets de muestras de red.

7.3.2 Campaña de verano tardío (C2)

Distribución y abundancia

El género *Azadinium* se encontró en 22 de un total de 25 muestras de botella, con abundancias celulares entre 20 y 19.000 cél. L⁻¹ y representando entre un 0,3 y un 53 % (promedio: 17 %) de la abundancia total de dinoflagelados. Las máximas abundancias se hallaron al sur del Golfo San Matías (Fig. 7.9). Debido a la gran abundancia de diatomeas presente en las muestras con *Azadinium*, lo cual dificultó la detección de células durante las observaciones al MEB, no se logró identificar a nivel específico a los ejemplares observados durante esta campaña. En las muestras de red no se encontraron células del género *Azadinium*.

Las células de *Azadinium* detectadas en esta campaña se encontraron en un rango de temperaturas entre 15 y 19 °C y a salinidades entre 31,9 y 34,1.

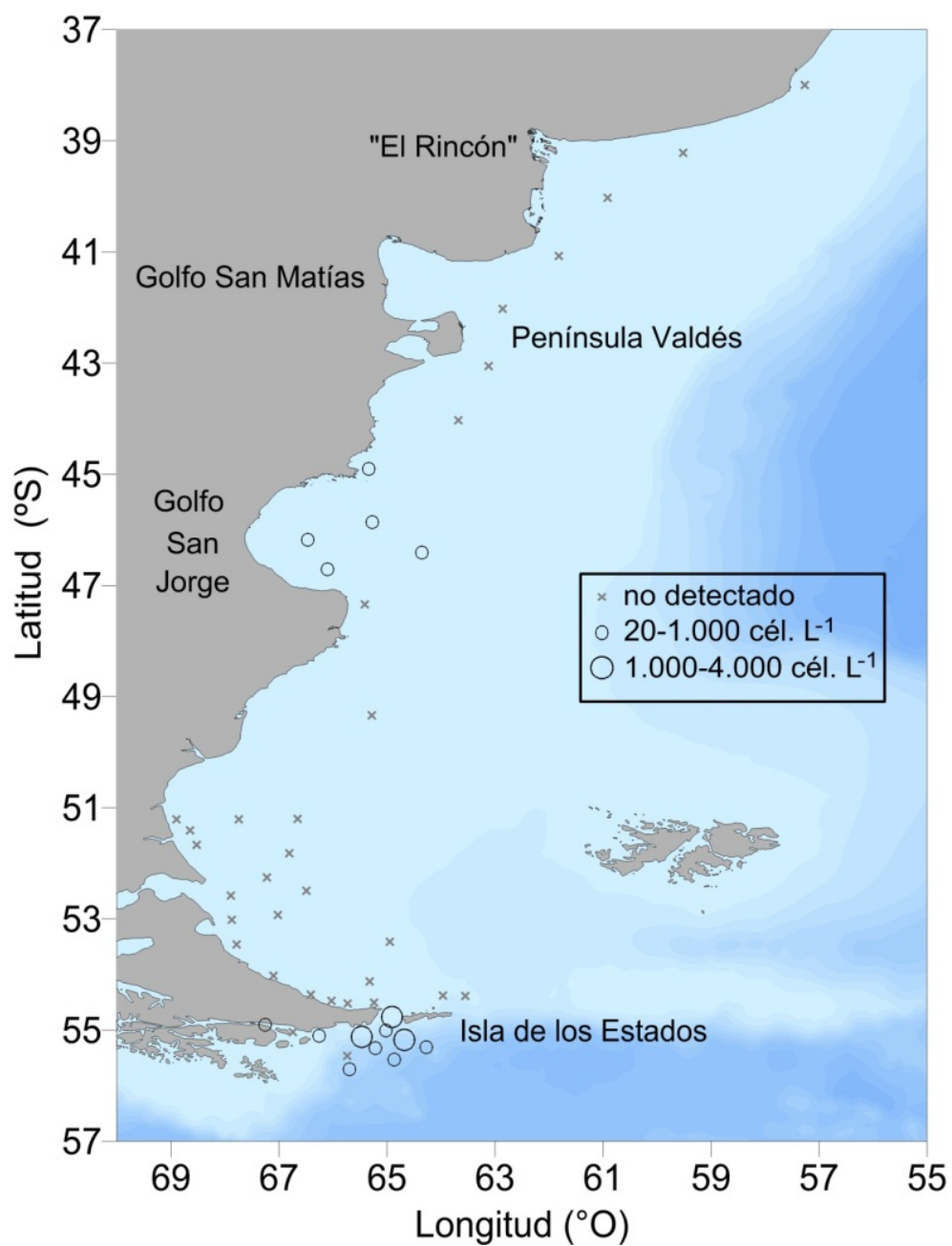


Fig. 7.8: Distribución y abundancia del género *Azadinium* en muestras de botella durante la C1.

Toxinas asociadas

No se detectaron azaspirácidos en los filtros correspondientes a las muestras de botella y tampoco en los pellets de muestras de red.

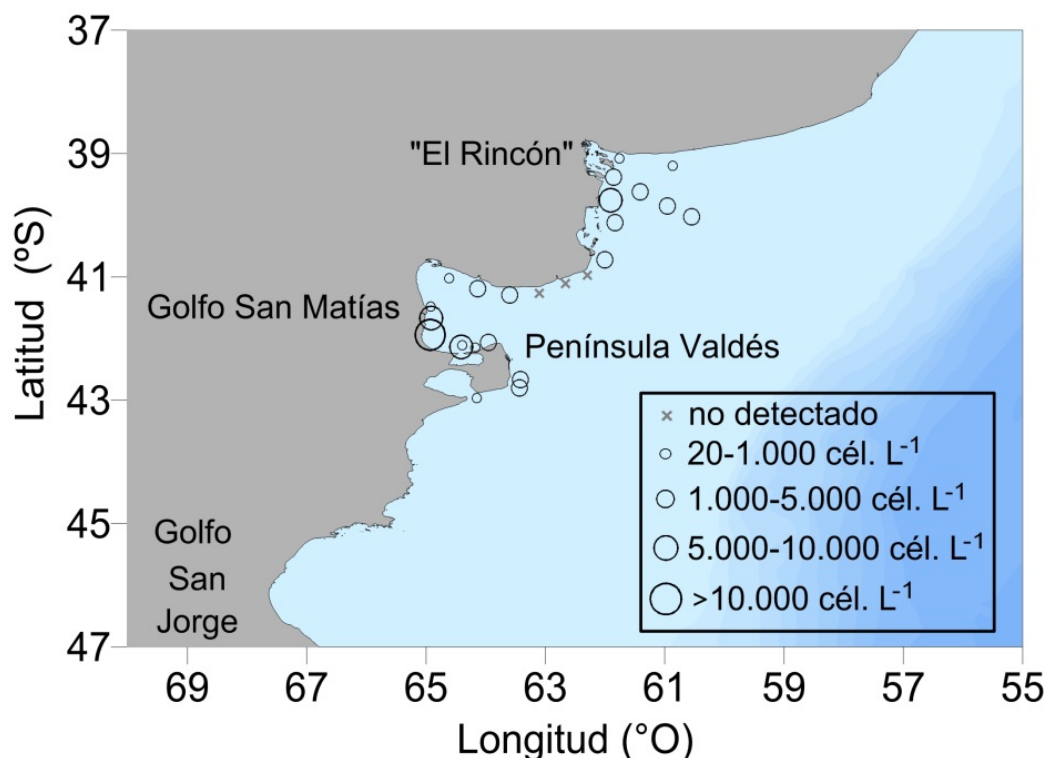


Fig. 7.9: Distribución y abundancia del género *Azadinium* en muestras de botella durante la C2.

7.3.3 Campaña de primavera (C3)

Distribución y abundancia

El género *Azadinium* se encontró en 26 de un total de 44 muestras de botella, con densidades celulares entre 20 y 154.000 cél. L⁻¹ y representó en esas estaciones entre un 0,05 y un 87 % de la abundancia total de dinoflagelados (promedio= 21 %). Las máximas abundancias se hallaron en aguas del talud a los 40 y 44 °S (Fig. 7.10A). Los análisis con microscopía electrónica permitieron detectar la presencia de cinco especies: *A. obesum*, *A. dexteroporum*, *A. luciferelloides*, *A. poporum* y ejemplares que se corresponden con una nueva especie en vía de ser publicada (Urban Tillmann com. pers.), nombrada en este trabajo como *Azadinium* sp. La presencia de *Azadinium* sp. y de *A. poporum* se confirmó en la estación 1 y la de *A. luciferelloides* en las estaciones 5 y 6, todas ellas correspondientes al sector norte del talud continental (~40 °S). *A. obesum* se encontró en las estaciones 5 y 43 y *A. dexteroporum* en las estaciones 7, 43 y 44, correspondientes en ambos casos a aguas del talud al norte (~40 °S) y centro (~44 °S) del área de estudio. También se detectaron células de *Azadinium* en tres muestras de red de la fracción de 20-50 µm y en una muestra de la fracción de 50-200 µm correspondientes al talud a los 40 °S y a aguas frente a Península Valdés.

Las células de *Azadinium* detectadas en esta campaña se encontraron en un rango de temperaturas entre 8 y 13,5 °C y a salinidades entre 33 y 34,1.

Toxinas asociadas

Se detectó la presencia de AZA-2 en 11 muestras de red de la fracción de 20-50 µm y en 11 de la fracción de 50-200 µm, 18 de ellas correspondientes a estaciones del talud desde los 39 a los 40 °S y desde los 44 a los 45°S, y cuatro de ellas correspondientes al Golfo San Matías, al Golfo Nuevo y al sur de Provincia de Buenos Aires (Fig. 7.7B). Las concentraciones de AZA-2 detectadas fueron bajas, 0,03 y 1,24 ng LR⁻¹, y en dos muestras de la fracción menor y en una de la mayor se detectaron también células de *Azadinium*, aunque en densidades menores a 10.000 cél. LR⁻¹. No se detectaron AZAs en los filtros correspondientes a las muestras de botella.

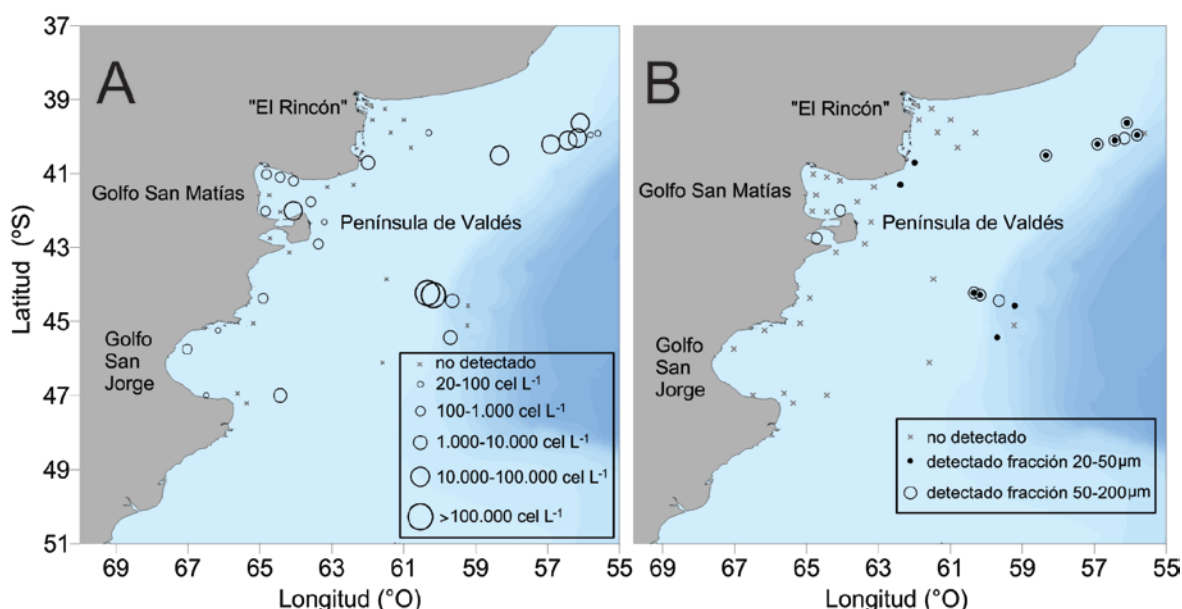


Fig. 7.10: Distribución y abundancia del género *Azadinium* en muestras de botella (A) y distribución de AZA-2 detectado a partir de muestras de red (B) a lo largo de la C3.

7.3.4 Campaña de verano (C4)

Distribución y abundancia

El género *Azadinium* se encontró en cuatro de un total de siete muestras de botella, presentando densidades celulares entre 100 y 3.000 cél. L⁻¹, en las que representó entre un 1,5 y un 10 % de la abundancia total de dinoflagelados (promedio= 4 %). Las máximas abundancias se hallaron al sur del Golfo San Jorge (47 °S) (Fig. 7.11). Debido a las bajas abundancias encontradas no se pudieron realizar

identificaciones a nivel específico durante esta campaña. En las muestras de red no se encontraron células del género *Azadinium*.

Las células de *Azadinium* detectadas en esta campaña se encontraron en un rango de temperaturas entre 5 y 11 °C y a salinidades entre 32,9 y 34.

Toxinas asociadas

No se detectaron azaspirácidos en los filtros correspondientes a las muestras de botella y tampoco en los pellets de muestras de red.

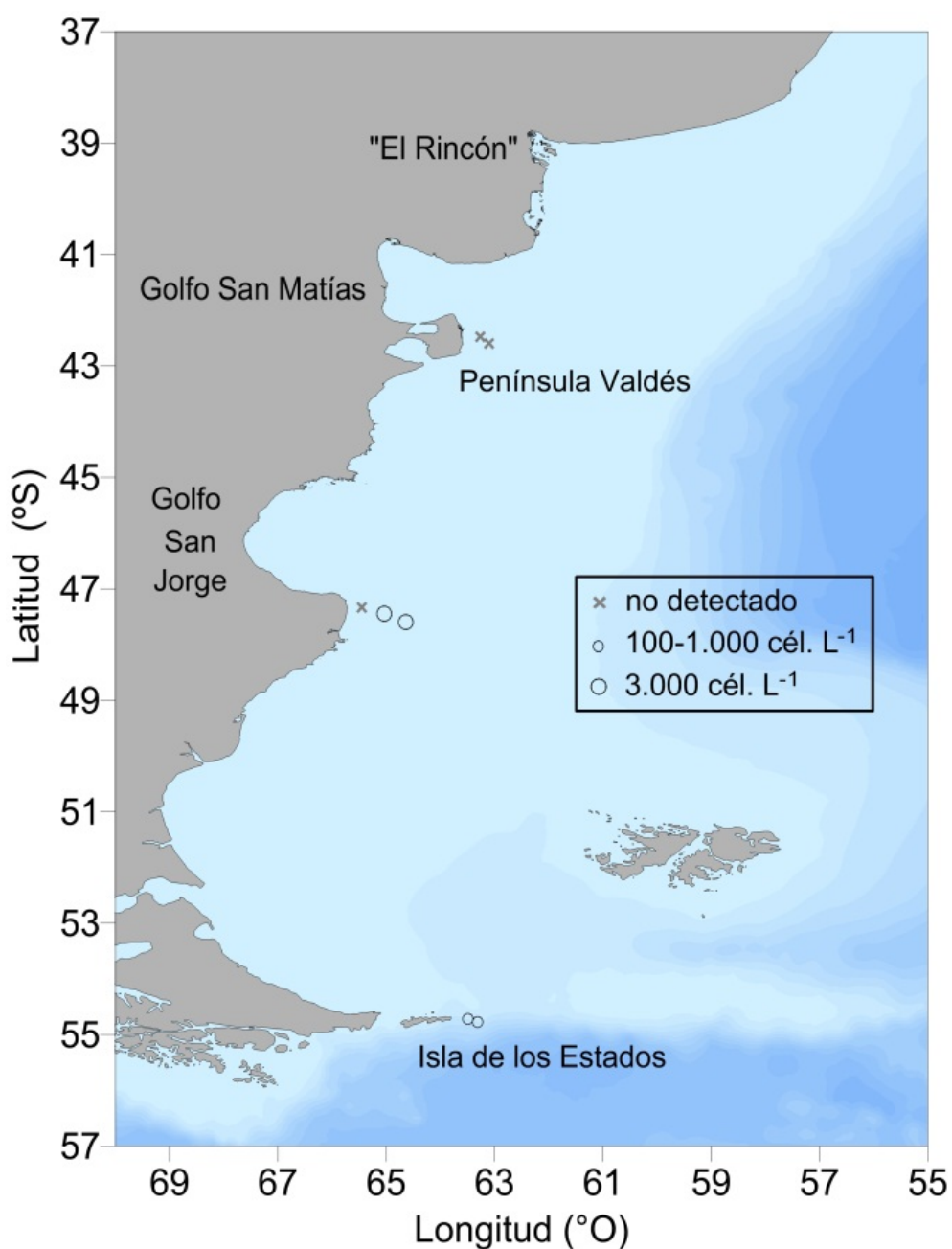


Fig. 7.11: Distribución y abundancia del género *Azadinium* en muestras de botella durante la C4.

7.4 Discusión y Conclusiones

El género *Azadinium* es el más reciente de los dinoflagelados toxígenos descubiertos a nivel mundial. A partir del descubrimiento de la capacidad de producción de AZA-1 en *A. spinosum* (Krock et al., 2009b) los estudios sobre este género se han multiplicado en todo el mundo, dando lugar en pocos años al hallazgo de nuevas especies y más de 30 análogos de AZAs (Hess et al., 2014a,b). En Argentina, Akselman & Negri (2012) dieron a conocer la presencia de *Azadinium* por primera vez para la región, basándose en una intensa floración que ocurrió en el talud al norte del Mar Argentino hace más de 30 años. Desde entonces, y posiblemente debido a la dificultad de identificar a las especies de este género, no se encuentran en la bibliografía citas de *Azadinium* en el Mar Argentino. No obstante, Turner & Goya (2015) encontraron trazas de AZA-2 en moluscos, colectados también en la parte norte de la Provincia de Buenos Aires.

El presente estudio confirma la presencia de especies de *Azadinium* y AZA-2 en muestras de plancton del Mar Argentino. Adicionalmente, los resultados obtenidos sugieren que el género *Azadinium* representa un componente frecuente del fitoplancton y presenta una amplia distribución latitudinal desde los ~38 a los ~55,5 °S. Sin embargo, las máximas abundancias (154.000 cél. L⁻¹) se detectaron en aguas del talud y adyacentes durante la campaña de primavera, en coincidencia con lo reportado para la floración de los '90 (Akselman & Negri, 2012).

La identificación taxonómica de las especies del género *Azadinium* es de gran complejidad debido al pequeño tamaño de sus células y a la necesidad de observar las características diagnósticas por medio de microscopía electrónica (Tillmann et al. 2009, 2010, 2011, 2012a, 2012b; Tillmann & Akselman, 2016). Dicha identificación se hace aún más compleja cuando se trata de muestras de campo, debido a las bajas densidades celulares y a la presencia conjunta de varias especies (Tillmann & Akselman, 2016). Sin embargo, a partir del análisis de concentrados de muestras de botella de la C3 correspondientes a aguas del talud en las cuales el género *Azadinium* se encontró en densidades celulares mayores a 30.000 cél. L⁻¹ pudo determinarse la presencia de cinco especies: *A. dexteroporum*, *A. luciferelloides*, *A. obesum*, *A. poporum* y *Azadinium* sp. mediante estudios ultraestructurales con microscopía electrónica. Asimismo, se pudo

confirmar la presencia de *A. dexteroporum* y *A. poporum* a partir de la mezcla y concentración de tres muestras de botella de la C1.

Los reportes previos de especies de *Azadinium* en el Mar Argentino (Akselman 2001, Akselman & Negri 2012; Tillmann & Akselman 2016) corresponden al análisis de una única muestra de la floración de 1991 antes mencionada, en la cual se detectaron cinco especies. Adicionalmente, durante este estudio se detectó la presencia de la especie *A. obesum* por primera vez para el área de estudio y de ejemplares que corresponden a una nueva especie en vías de ser publicada. En consecuencia el Mar Argentino parece ser un área de gran diversidad para género, ya que se han detectado hasta el momento seis de las 12 especies descriptas a nivel mundial.

La nueva cita presentada en este trabajo, *A. obesum*, se describió en base al análisis de cultivos celulares del Mar del Norte. Se diferencia de otras especies del género por presentar el vp en la región posterior izquierda de la placa 1', por la ausencia de espina antapical, su forma más o menos ovoide y su mayor tamaño (Tillmann et al., 2010). Los cultivos de la especie no presentaron producción de ningún AZA conocido hasta el momento (Tillmann et al., 2010).

A. luciferelloides fue descripta recientemente a partir del análisis de una muestra de campo obtenida en 1991, correspondiente a la floración de *Azadinium* observada en aguas del talud a los 38 °S (Tillmann & Akselman, 2016). En el presente trabajo la presencia de *A. luciferelloides* pudo ser confirmada en muestras recientes, también en aguas del talud a los 40 °S. Las células analizadas se determinaron principalmente en base a la distribución de los poros, lo cual la diferencia de las otras tres especies del género (*A. caudatum*, *A. dexteroporum* y *A. concinnum*) que poseen una ubicación similar del vp, en la región derecha de Po (Tillmann & Akselman, 2016). El rango de tamaños hallado (largo 7,4 a 13,6 µm y ancho de 4,8 a 10,2 µm) resultó muy cercano al descripto anteriormente (largo de 6,4 a 14,1 µm y ancho de 7,6 a 11,6 µm) (Tillmann & Akselman, 2016).

A. dexteroporum fue descripta a partir de muestras del golfo de Nápoles en el Mar Mediterráneo (Percopo et al., 2013). Tillmann & Akselman (2016) la encontraron formando parte de la floración de 1991 en el Mar Argentino, aunque en proporciones menores al 6,5% del total de células identificadas como pertenecientes a la familia *Amphidomataceae*. En este estudio la presencia de esta especie se confirmó para aguas del talud cercanas al sitio de la floración de 1991 (≈38 °S), pero mostró además una distribución más austral, alcanzando alrededor de los 55 °S durante la C1 y los 44 °S

durante la C3. Morfológicamente, pudo diferenciarse de otras especies del género por presentar una placa intercalar 2a cóncava, formando una depresión en la teca, y el vp ubicado en la región derecha de Po. Tanto en las células analizadas en este estudio como en las encontradas por Tillmann & Akselman (2016) el vp se ubica más cerca de Po que en los especímenes del mediterráneo (Percopo et al., 2013).

A. poporum fue descripta a partir de cultivos del Mar del Norte (Tillmann et al., 2011) y luego identificada en las costas de Corea y China (Potvin et al., 2012; Gu et al., 2013). Recientemente, cultivos celulares de *A. poporum* obtenidos a partir de quistes presentes en sedimentos de la región de “El Rincón”, al sur de la Provincia de Buenos Aires, presentaron una particularidad morfológica no observada previamente en la especie: un grupo de poros en la segunda placa antapical (Tillmann et al., 2016b). La presencia de este grupo de poros se observó nuevamente en los ejemplares de *A. poporum* encontrados durante este estudio, los cuales se observaron tanto durante la C1 y C3 en aguas profundas próximas al talud, a los 55 °S y ~40 °S respectivamente.

Finalmente durante este estudio se encontraron ejemplares pertenecientes al género *Azadinium*, según su fórmula tabular, pero cuya morfología no se corresponde con ninguna de las especies descriptas hasta el momento. No obstante, ejemplares similares fueron detectados durante la floración antes mencionada en el año 1991 y parecen corresponder a una nueva especie en vías de ser publicada (Urban Tillmann com. pers.). Esta especie puede ser diferenciada principalmente por poseer una teca rugosa y el vp en la región anterior izquierda de la placa 1'. En este estudio se la detectó en una estación en aguas del talud al norte del área de estudio, en la misma zona que ocurrió la floración de los '90.

Mediante el análisis de toxinas realizado a partir de pellets de muestras de red de la C3 se detectaron por primera vez para el área de estudio la presencia de concentraciones cuantificables de AZAs, tanto a partir de la fracción de 20-50 µm como de 50-200 µm. En tres de las 22 muestras en las que se detectó AZA también se encontraron células de *Azadinium* sp. en las muestras de red, lo cual podría deberse a la obstrucción de la red, ya que las células de *Azadinium* son de menor tamaño (<18 µm) que el poro de la red de fitoplancton utilizada (20 µm). A pesar de la presencia de células de especies de *Azadinium* productoras de AZA en algunas de las estaciones, como *A. dexteroporum*, es de esperar que en todos los casos la toxina estuviera concentrada en depredadores de *Azadinium*, con lo cual no es posible realizar una asociación directa entre la detección de AZA y la presencia de las células de *Azadinium*

en los pellets. La transmisión de AZA a través de la red trófica se ha documentado previamente en dinoflagelados heterótrofos y ciliados (Krock et al., 2009b; Akselman & Negri, 2012), e incluso fue la causa de que durante muchos años se considerara a *Protoperidinium crassipes* como productor de AZAs (Yasumoto, 2001; James et al., 2003a,b). En este sentido, depredadores potenciales de *Azadinium*, y en consecuencia vectores de AZAs, como dinoflagelados de los géneros *Tripes* o *Protoperidinium* sp., ciliados y larvas de copépodos fueron un componente frecuente del nano y microplancton durante la C3.

Por otro lado, en 13 de las 15 estaciones de muestreo en las que se detectó AZA en las muestras de red se observaron células de *Azadinium* en abundancias mayores a 10.000 cél. L⁻¹ durante los conteos de muestras de botella, lo cual apoya la idea de una transmisión trófica de la toxina. En otras 14 estaciones se detectaron células de *Azadinium* en las muestras de botella pero no hubo detección de AZAs en los pellets, aunque las densidades celulares encontradas en dichas muestras fueron bajas (<1000 cél. L⁻¹). En estos casos las células podrían corresponder a especies no tóxicas del género, ya que mediante los análisis microscópicos no pudieron determinarse a nivel de especie. En este sentido, de las 12 especies de *Azadinium* descritas hasta el momento únicamente se ha probado la producción de AZAs para tres de ellas (Tillmann et al., 2009; Krock et al., 2012; Percopo et al., 2013; Luo et al., 2017), así también, de las cinco especies detectadas durante este estudio las únicas para las cuales se ha comprobado la producción de azaspirácidos hasta el momento son *A. dexteroporum* y *A. poporum*. Esto también podría explicar la no detección de toxinas en los filtros de muestras de botella a pesar de las altas densidades celulares de representantes del género detectadas durante la C3.

De los aproximadamente 30 análogos de AZAs descritos hasta el momento, en este estudio se detectó únicamente al análogo AZA-2, el mismo encontrado por Turner & Goya (2015) en moluscos colectados en la Provincia de Buenos Aires. Sin embargo, no fue posible realizar una asociación certera entre las especies tóxicas de *Azadinium* encontradas en las muestras de botella (*A. poporum* y *A. dexteroporum*) y el análogo AZA-2 detectado a partir de las muestras de red, debido en parte a la variabilidad de perfiles registrada previamente para estas especies en condiciones de cultivo. El perfil de toxinas de *A. dexteroporum* determinado a partir del cultivo del Mar Mediterráneo con el que se realizó su descripción original mostró bajas cantidades de AZA-3 y AZA-7 (Percopo et al., 2013), mientras que un cultivo obtenido del Ártico (Mar de Irminger)

no presentó producción de azaspirácidos (Tillmann et al., 2015), con lo cual no se ha registrado, hasta el momento, la producción de AZA-2 por parte de *A. dexteroporum*. Por otro lado, los análisis de toxinas realizados con cultivos de *A. poporum* obtenidos de muestras de sedimentos correspondientes a aguas de plataforma adyacentes al sur de la Provincia de Buenos Aires y aguas cercanas al talud mostraron un perfil dominado por AZA-2 (> 95%) (Tillmann et al., 2016b). Sin embargo, se observó una gran variabilidad en los perfiles de seis cultivos correspondientes a *A. poporum* de China, tres de los cuales produjeron únicamente AZA-2, uno presentó un perfil dominado por un análogo descrito recientemente para un cultivo de Corea, otro un perfil compuesto únicamente de un nuevo AZA, y por último uno de los cultivos no presentó producción de AZA (Gu et al., 2013). Sumado a esto tampoco es posible descartar que *A. spinosum*, la otra especie confirmada como productora de AZA-2 y detectada en la floración de *Azadinium* de 1991 (Tillmann & Akselman, 2016) haya estado presente en las muestras de este estudio en abundancias tan bajas que no permitieran su detección. Tampoco se ha evaluado la producción de AZA en cultivo para *A. luciferelloides*, ni para la nueva especie aún no descrita (en este estudio *Azadinium* sp.). Por lo tanto, para determinar los perfiles tóxicos de las especies del género *Azadinium* en el Mar Argentino resulta imprescindible el establecimiento de cultivos celulares.

Tanto la presencia de las mencionadas especies como la nueva cita de *A. obesum* para la zona, así como el hallazgo de AZA-2 en el nano y microplankton denotan la necesidad de realizar más estudios del género ya que representa una posible fuente de FANs e intoxicaciones por AZAs en la Argentina.

Capítulo 8: Consideraciones Finales

En el presente estudio se analizó la presencia de dinoflagelados tóxicos y sus respectivas toxinas durante cuatro campañas de muestreo realizadas en diferentes estaciones del año y abarcando una extensa área del Mar Argentino, desde los 39 a los 55°S. Los principales resultados obtenidos incluyen la detección de cinco géneros de dinoflagelados tóxicos, de los cuales cuatro presentaron especies asociadas a distintos grupos de ficotoxinas: *Dinophysis* (PTX, AO), *Alexandrium* (TPM, SPX), *Protoceratium* (YTX) y *Azadinium* (AZA). La mayoría de los géneros mencionados presentaron especies que no habían sido citadas previamente para la zona (Fig. 8.1) y toxinas asociadas detectadas por primera vez en muestras de nano y microplankton en el área de estudio. Así también se confirmaron registros de taxones tóxicos descriptos recientemente a nivel mundial.

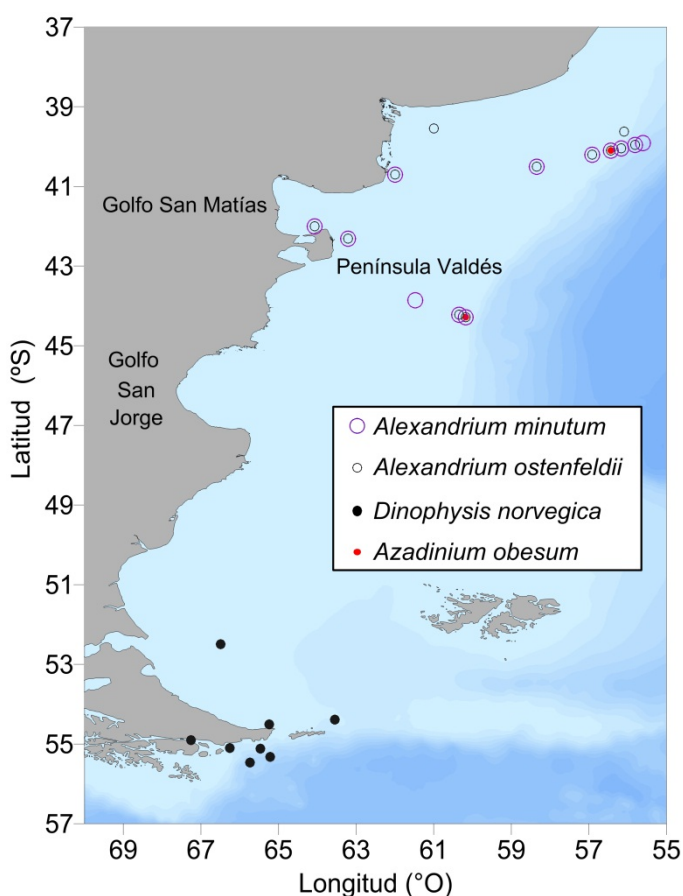


Fig. 8.1: Distribución de las especies que representan nuevas citas para el área de estudio.

El género *Dinophysis* mostró una amplia distribución en el Mar Argentino y fue comúnmente detectado en primavera, verano, verano tardío y otoño. Se encontró representado principalmente por *D. acuminata*, aunque *D. tripos* también fue encontrada con frecuencia y en algunos casos alcanzando las mayores densidades para el género. Ambas especies se encontraron relacionadas con la presencia de toxinas, principalmente PTX-2 y PTX-11. Adicionalmente en el presente estudio se propone a *D. tripos* como especie productora de PTX-2sa, un análogo asociado comúnmente a modificaciones de la PTX-2 que ocurren como resultado de la digestión en moluscos. Por el contrario, *D. caudata* y *D. norvegica*, las otras dos especies toxígenas encontradas, no se asociaron a la detección de toxinas debido a sus bajas densidades. No obstante, la detección de *D. norvegica*, por primera vez en el suroeste Atlántico, no debe ser subestimada considerando que es una especie toxígena productora de floraciones y relacionada con eventos de intoxicación por TDM en el hemisferio Norte (Blanco et al., 2005). La ausencia general de DTX y la escasez de AO observada en este estudio podrían reflejar una tendencia de las poblaciones de *Dinophysis* presentes en el Mar Argentino a producir principalmente PTX, como ha sido observado en otras partes del mundo como consecuencia de factores regionales tanto genéticos como ambientales (Reguera et al., 2014).

El género *Alexandrium* es considerado como el principal agente causante de eventos de intoxicación tanto a nivel mundial como en Argentina (Carreto et al., 2002; Gayoso & Fulco, 2006; Montoya & Carreto, 2007; Anderson et al., 2012). En este estudio, *Alexandrium* mostró una amplia distribución en el Mar Argentino, lo cual coincide con los estudios pioneros de Balech (1995). Las máximas abundancias, mayor frecuencia y diversidad específica se detectaron durante la primavera y desde los 44 a los 46 °S, incluyendo el Golfo San Jorge y aguas adyacentes. Estudios moleculares permitieron confirmar la presencia de *A. minutum* y *A. ostenfeldii*, dos especies registradas por primera vez para el área de estudio, lo cual representa un hecho de gran relevancia para futuros programas de monitoreo, dado que son especies que ocasionan FANs en distintas regiones del mundo (Anderson et al., 2012). Asimismo la secuenciación de ADN a partir de células aisladas en una muestra de campo colectada en las cercanías de Península Valdés permitió identificar a los organismos como *A. catenella*, lo cual representa un importante aporte al conocimiento del género en términos moleculares, considerando que para Argentina existían datos genéticos únicamente para tres cepas de *Alexandrium* (Penna et al., 2008; Ho et al., 2012;

Sunesen, comunicación personal). No obstante, se encontraron ciertas discrepancias entre los resultados de los análisis moleculares y microscópicos, como por ejemplo, la alta frecuencia y abundancia de representantes del complejo *A. tamarense* detectadas mediante técnicas de microscopía en muestras en las cuales las pruebas moleculares aplicadas para cuatro de los cinco ribotipos del complejo indicaron solo bajas señales del ribotipo I. Por otro lado, los análisis morfológicos indicaron la presencia de células con características similares a *A. minutum* pero que no coincidieron completamente con su descripción clásica, mientras que las pruebas moleculares resultaron positivas para la mencionada especie. En consecuencia, los resultados obtenidos ponen en evidencia la necesidad de utilizar de manera conjunta análisis morfológicos y moleculares en estudios de diversidad y composición fitoplanctónica en la zona. Así también, los resultados sugieren que no debe subestimarse la posibilidad de que la variabilidad genética dentro de las poblaciones de *Alexandrium* a nivel local o regional afecte la eficiencia de los marcadores moleculares diseñados para poblaciones de otras regiones geográficas.

Resultados del presente trabajo permitieron asociar por primera vez para el área de estudio la presencia de *A. ostenfeldii* con la detección de SPX. Por otro lado, la presencia de células del complejo *A. tamarense* y de *A. minutum* se encontró asociada con la detección de una gran variedad de perfiles de TPM, lo cual ha sido detectado previamente tanto en muestras de campo como en cultivos de distintas áreas del Mar Argentino (Carreto et al., 2001; Montoya et al., 2010). La presencia simultánea de *A. minutum* y el complejo *A. tamarense*, detectada por primera vez en este estudio, podría ayudar a explicar la variación en los perfiles de TPM antes mencionada. Asimismo, la detección de nuevas especies denota la necesidad de continuar y profundizar los estudios sobre el género *Alexandrium* en la zona, especialmente mediante el establecimiento de cultivos celulares que permitan aumentar el conocimiento sobre la variabilidad de las características morfológicas, genéticas y toxinológicas de este género tan importante respecto de FANs e intoxicaciones humanas en el mundo y en Argentina en particular.

La especie productora de YTX *Protoceratium reticulatum* se detectó principalmente durante otoño y primavera y presentó una distribución mayormente restringida al Golfo San Jorge. Su presencia estuvo asociada a la detección de YTX en fitoplancton. Por otro lado, la especie *Gonyaulax spinifera*, también productora de YTX en otras partes del mundo (Riccardi et al., 2009), fue observada con mayor frecuencia y

con una distribución más amplia, pero su presencia no mostró una asociación clara con la detección de YTX, lo cual sugiere que *P. reticulatum* representa el principal productor en el Mar Argentino.

El género *Azadinium* es el más reciente de los géneros de dinoflagelados tóxicos a nivel mundial. A partir de su descripción en el año 2009 han surgido reportes de diferentes especies en todo el mundo. En particular en Argentina, el género fue encontrado formando una intensa floración en los años 90 (Akselman & Negri, 2012). El análisis reciente de muestras de esa floración ha resultado en la detección de tres especies y en la descripción de una nueva especie del género (Tillmann & Akselman, 2016). Luego del mencionado trabajo no se ha vuelto a citar la presencia de especies de *Azadinium* en muestras de campo del Mar Argentino, presumiblemente y en parte, a causa de que su identificación microscópica es compleja debido al pequeño tamaño de sus células (Tillmann et al., 2009, 2010, 2012a, 2012b). En el presente estudio, mediante la concentración de muestras de botella y aislamiento individual de células utilizando micropipetas para su posterior observación con microscopía electrónica, se observó a *Azadinium* como un componente frecuente y en algunos casos abundante del fitoplancton, y con una distribución amplia que se extendió hasta los 55 °S. Con respecto a su riqueza específica, se confirmó la presencia en muestras recientes de tres de las cuatro especies del género citadas previamente para el Mar Argentino durante la floración de los '90 (*A. dexteroporum*, *A. poporum* y *A. luciferelloides*). Asimismo, se detectó a *A. obesum* por primera vez para el área de estudio y se observaron ejemplares correspondientes a una nueva especie en vías de ser publicada (Tillmann, com. pers.). Por otro lado, se detectó por primera vez la presencia de AZA-2 en muestras de fitoplancton colectadas en aguas cercanas al talud a los 40 °S, aunque en concentraciones bajas. A pesar de ello, la detección de especies potencialmente tóxicas de *Azadinium* representa un riesgo potencial de intoxicación por azaspirácidos en el Mar Argentino, debido a la amplia distribución geográfica y las elevadas abundancias detectadas, especialmente en la zona del talud y aguas de plataforma externa.

Especie	Campañas en las que estuvo presente	Distribución	Análisis moleculares	Toxinas asociadas	Observaciones
<i>D. acuminata</i>	C1 (otoño), C2 (verano tardío), C3 (primavera), C4 (verano)	39-55,5 °S. Talud y plataforma		PTX-2, PTX-11, AO	Las cuotas de PTX total fueron mayores hacia el sur del área de estudio y en aguas del talud
<i>D. tripos</i>	C1 (otoño), C2 (verano tardío), C3 (primavera), C4 (verano)	39-42 °S. Plataforma		PTX-2, PTX-2sa, PTX-11	Además de las células grandes típicas se encontraron células intermedias y pequeñas, las cuales corresponden a gametos de la especie
<i>D. caudata</i>	C1 (otoño)	38° S. Plataforma			Presente únicamente en muestras de red
<i>D. norvegica</i>	C1 (otoño)	52-55 °S. Talud y plataforma			Presente únicamente en muestras de red
<i>A. catenella</i>	C1 (otoño), C2 (verano tardío), C3 (primavera), C4 (verano)	38-52 °S. Talud y plataforma	PCR de muestras de campo y PCR de células aisladas y análisis filogenéticos	GTX2/3, GTX1/4, C1/2, STX, NEO-STX y B1	Presencia de quistes de película
<i>A. minutum</i>	C3 (primavera)	40-45 °S. Talud y plataforma	PCR de muestras de campo	GTX1/4, GTX2/3 y STX	Presencia de quistes de película
<i>A. ostenfeldii</i>	C3 (primavera)	40-45 °S. Talud y plataforma	PCR de muestras de campo	SPX1 y 20-Me SPX-G	Presencia de quistes de película
<i>P. reticulatum</i>	C1 (otoño) y C3 (primavera)	40-47 °S. Talud y plataforma.		YTX	Distribución mayormente restringida al Golfo San Jorge.
<i>G. spinifera</i>	C1 (otoño), C2 (verano tardío), C3 (primavera), C4 (verano)	39-55 °S. Talud y plataforma.			

Tabla 8.1: Resumen de las especies de dinoflagelados toxígenos encontrados durante este estudio y las principales características.

Referencias

- Aasen, J., Samdal, I. A., Miles, C. O., Dahl, E., Briggs, L. R., Aune, T., 2005. Yessotoxin in Norwegian blue mussels (*Mytilus edulis*): uptake from *Protoceratium reticulatum*, metabolism and depuration. *Toxicon* 45, 265–272.
- Acha, E. M., Mianzan, H. W., Guerreroa, R. A., Favero, M., Bava, J., 2004. Marine fronts at the continental shelves of austral South America: Physical and ecological processes. *J. Marine Syst.* 44 (1–2), 83–105.
- Aguilera-Belmonte, A., Inostroza, I., Franco, J. M., Riobo, P. & Gomez, P. I. 2011. The growth, toxicity and genetic characterization of seven strains of *Alexandrium catenella* (Whedon and Kofoid) Balech 1985 (Dinophyceae) isolated during the 2009 summer outbreak in southern Chile. *Harmful Algae* 12, 105–12.
- Aguilera-Belmonte, A., Inostroza, I., Carrillo, K. S., Franco, J. M., Riobo, P., Gomez, P. I., 2013. The combined effect of salinity and temperature on the growth and toxin content of four Chilean strains of *Alexandrium catenella* (Whedon and Kofoid) Balech 1985 (Dinophyceae) isolated from an outbreak occurring in southern Chile in 2009. *Harmful Algae* 23, 55–59.
- Akselman, R., 1996. Estudios ecológicos en el Golfo de San Jorge y adyacencias (Atlántico sudoccidental). Distribución, abundancia y variación estacional del fitoplancton en relación a factores físico-químicos y la dinámica hidrográfica. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 234 pp.
- Akselman, R., 1999. Dinofíceas toxigénicas o potencialmente nocivas en la plataforma argentina: un reporte actualizado sobre su estudio. *Notas Botánicas, Soc. Arg. De Botánica, Conferencias sobre Aspectos Metodológicos en Algas*, pp. 13-20.
- Akselman, R., 2001. Un nuevo dinoflagelado (Peridinales, Dinophyceae) causante de discoloraciones en el Atlántico Sudoccidental. *Bol. Soc. Argent. Bot. (Supl.)*, p. 55.
- Akselman, R., Negri, A., 2012. Blooms of *Azadinium cf. spinosum* Elbrächter et Tillmann (Dinophyceae) in northern shelf waters of Argentina, Southwestern Atlantic. *Harmful Algae* 19, 30–38.
- Akselman, R., Krock, B., Alpermann, T. J., Tillmann, U., Borel, M., Almandoz, G. O., Ferrario, M. E., 2015. *Protoceratium reticulatum* (Dinophyceae) in the austral Southwestern Atlantic and the first report on YTX-production in shelf waters of Argentina. *Harmful Algae* 45, 40–52.
- Almandoz, G. O., Ferrario, M. E., Ferreyra, G. A., Schloss, I. R., Esteves, J. L., Paparazzo F. E., 2007. The genus *Pseudonitzschia* (Bacillariophyceae) in continental shelf waters of Argentina (Southwestern Atlantic Ocean, 38–55 degrees S). *Harmful Algae* 6, 93–103.
- Almandoz, G. O., Montoya, N. G., Hernando, M. P., Benavides, H. R., Carignan, M. O., Ferrario, M. E., 2014. Toxic strains of the *Alexandrium ostenfeldii* complex in southern South America (Beagle Channel, Argentina). *Harmful Algae* 37, 100–109.

- Almandoz, G. O., Fabro E., Ferrario, M., Tillmann, U., Cembella, A., Krock, B., 2017. Species occurrence of the potentially toxigenic diatom genus *Pseudo-nitzschia* and the associated neurotoxin domoic acid in the Argentine Sea. *Harmful Algae* 63, 45–55.
- Alpermann, T. J., Tillmann, U., Beszteri, B., Cembella, A. D., John, U., 2010. Phenotypic variation and genotypic diversity in a planktonic population of the toxigenic marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 46, 18–32.
- Álvarez, G., Uribe, E. Díaz, R. Braun, M. Mariño, C. Blanco, J., 2011. Bloom of the Yessotoxin producing dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* (Dinophyceae) in Northern Chile. *J. Sea Res.* 65, 427–434.
- Alves-de-Souza, C., Varela, D., Contreras, C., de La Iglesia, P., Fernández, P., Hipp, B., Hernández, C., Riobó, P., Reguera, B., Franco, J., M., Diogène, J., García, C., Lagos, N., 2014. Seasonal variability of *Dinophysis* spp. and *Protoceratium reticulatum* associated to lipophilic shellfish toxins in a strongly stratified Chilean fjord. *Deep-Sea Res. 2, Topical Stud. Oceanogr.* 101, 152–162.
- Anderson, D. M., Alpermann, T. J., Cembella, A. D., Collos, Y., Masseret, E., Montresor, M., 2012a. The globally distributed genus *Alexandrium*: Multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae* 14, 10–35.
- Anderson, D. M., Cembella, A. D., Hallegraeff, G. M., 2012b. Progress in understanding harmful algal blooms: paradigm shifts and new technologies for research, monitoring, and management. *Ann Rev Mar Sci* 4, 143–176
- Andrinolo, D., Santinelli, N., Otano, S., Sastre, V. & Lagos, N. 1999. Paralytic shellfish toxins in mussels and *Alexandrium tamarense* at Valdes Peninsula, Chubut, Patagonia, Argentina: Kinetics of a natural depuration. *J. Shellfish Res.* 18(1), 203–209.
- Armstrong, M. & Kudela, R., 2006. Evaluation of California isolates of *Lingulodinium polyedrum* for the production of yessotoxin. *Afr. J. Mar. Sci.* 28, 399–401
- Arrigo K., 2005. Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature* 437, 349–355.
- Aune, T., Sorby, R., Yasumoto, T., Ramstad, H., Landsverk, T., 2002. Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of yessotoxins towards mice. *Toxicon* 40, 77–82.
- Balech, E., 1988. Los dinoflagelados del Atlántico Sudoccidental. *Publ. Espec., Inst. Español de Oceanogr.* 1, 310 pp.
- Balech, E., 1995. The Genus *Alexandrium* Halim (Dinoflagellata). Sherkin Island Marine Station, Cork, Ireland, p. 151.
- Balech, E., 2002. Dinoflagelados tóxicos del cono sur americano. En: Sar, E. A., Ferrario, M. E., Reguera, B. (Eds.), *Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano*. Instituto Español Oceanográfico de Madrid, Vigo, pp. 125–144.
- Balch, W. M., Drapeau, D., Bowler, B., Lyczekowski, E., Lubelczyk, L. C., Painter, S. C. and Poulton, A. J., 2014. Surface biological, chemical, and optical properties of the Patagonian Shelf coccolithophore bloom, the brightest waters of the Great Calcite Belt. *Limnol. Oceanogr.*, 59, 1715–1732.

- Belin, C. 1993. Distribution of *Dinophysis* spp. and *Alexandrium minutum* along French coasts since 1984 and their DSP and PSP toxicity levels. En Smayda, T. J. & Shimizu, Y. (Eds.), Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Elsevier, Amsterdam, p. 469–474.
- Benavides, H., Prado, L., Diaz, S., Carreto, J. I., 1995. An exceptional bloom of *Alexandrium catenella* in the Beagle Channel, Argentina. En: Lassus, P., Arzul, G., Erard-le Denn, E., Gentien, P., Marcaillou-Le Baut, C. (Eds.), Harmful Marine Algal Blooms. Lavoisier Intercept Ltd., pp. 113–119.
- Bertolotti M. I., Brunetti N. E., Carreto J. I., Prenski L. B., Sánchez R.P., 1996. Influence of shelf-break fronts on shellfish and fish stocks off Argentina. *Int. Council Explor. Sea*, CM 1996/S: 41 (Sect. S), 15 pp, 9 figs.
- Blanco, J., Moroño, A., Fernández, M. L., 2005. Toxic episodes in shellfish, produced by lipophilic phycotoxins: an overview. *Rev. Gal. Rec. Mar.* (Monog.) 1, 70 [Online] <http://www.recmar-galicia.org/abstract.asp?Idpro=3>
- Blanco, J., Álvarez, G., Uribe, E., 2007. Identification of pectenotoxins in plankton, filter feeders, and isolated cells of a *Dinophysis acuminata* with an atypical toxin profile, from Chile. *Toxicon* 49, 710–716.
- Bøe, R., Giersten, B. T., Vintermyr, D. K., Hunge, G., Lanolte, M. & Doskeland, S. F., 1991. *Exp. Cell Res.* 195, 237–246.
- Boltovskoy, 1995. Taxonomía y morfología de los dinoflagelados: Métodos de trabajo. En: Manual de métodos ficológicos. Alveal, K., Ferrario, M. E., Oliveira, E. C., Sar, E. Universidad de Concepción, Chile.
- Borkman, D. G., Smayda, T. J., Tomas, C. R., York, R., Strangman, W., Wright, J., 2012. Toxic *Alexandrium peruvianum* (Balech and de Mendiola) Balech and Tangen in Narragansett Bay, Rhode Island (USA). *Harmful Algae* 19, 92–100.
- Branco, S., Oliveira, M. M., Salgueiro F., Menezes M. Morphology and molecular description of two species of *Alexandrium* from a tropical estuary in southeastern Brazil: *Alexandrium fragae* sp. nov. and *Alexandrium tamutum*. 17th International Conference on Harmful Algae, Brazil.
- Braña M., A, Lehané, M, Kryś S, Fernández, M. L., Furey, A., James, K., J., 2003. The first identification of azaspiracids in shellfish from France and Spain. *Toxicon* 42, 105–108.
- Bravo, I., Figueroa, R. I., Garcés, E., Fraga, S., Massanet, A., 2010. The intricacies of dinoflagellate pellicle cysts: the example of *Alexandrium minutum* cysts from a bloom-recurrent area (Bay of Baiona, NW Spain). *Deep-Sea Res. II* 57, 166–74.
- Burson, A., Matthijs, H., de Bruijne, W., Talens, R., Hoogenboom, R., Gerssen, A., Visser, P., Stomp, M., Steur, K., van Scheppingen, Y. & Huisman, J., 2014. Termination of a toxic *Alexandrium* bloom with hydrogen peroxide. *Harmful Algae* 31, 125–135.
- Bütschli, O., 1885. Dinoflagellata, in Protozoa (1880-89) in Bronn. Klass u. *Ordn. Des Tierreichs* 1, 906–1029, pl. 51–55.
- Campagna, C, Verón C, Falabella V, 2006. Situación ambiental en la ecorregión del Mar Argentino. In: Brown A, Martínez Ortiz U, Acerbi M, Corcuera J (Eds.), La Situación Ambiental Argentina 2005, Fundación Vida Silvestre Argentina, Buenos Aires, pp. 322–337.

- Carreto, J. I., Lasta, M. L., Negri, R. M., Benavides, H. R. 1981. Los fenómenos de marea roja y toxicidad de moluscos bivalvos en el Mar Argentino. *Contrib. Inst. Nac. Invest. Desarr. Pesq.* 399, 89.
- Carreto, J. I., Benavides, H. R., Negri, R. M., Glorioso, P. D., 1986. Toxic red-tide in the Argentine Sea. Phytoplankton distribution and survival of the toxic dinoflagellate *Gonyaulax excavata* in a frontal area. *J. Plankton Res.* 8, 15–28.
- Carreto, J. I., Lutz, V. A., Carignan, M. O., Cucchi Colleoni, A. D., De Marco, S. G., 1995. Hydrography and chlorophyll a in a transect from the coast to the shelf-break in the Argentinian Sea. *Cont Shelf Res* 15, 315–33.
- Carreto, J. I., Carignan, M. O., Montoya, N. G., 2001. Comparative studies on mycosporine-like amino acids, paralytic shellfish toxins and pigment profiles of the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense*, *A. catenella* and *A. minutum*. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 223, 49–60.
- Carreto, J. I., Akselman, R., Benavides, H., Montoya, N.G. & Negri, R. 2002. El proyecto “Marea Roja” del Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero. En: Sar, E. A., Ferrario, M. E., Reguera, B. (Eds.), Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano. Instituto Español de Oceanografía, Madrid, pp. 209–215.
- Carreto, J. I., Montoya, N. G., Benavides, H. R., Guerrero, R., Carignan, M. O., 2003. Characterization of spring phytoplankton communities in the Río de la Plata maritime front using pigment signatures and cell microscopy. *Mar. Biol.* 143, 1013–1027.
- Carreto, J. I., Carignan, M. O., Montoya, N. G., Cucchi Colleoni, D. A., 2007. Ecología del fitoplancton en los sistemas frontales del Mar Argentino. En: Carreto, J. I., Bremec, C. (Eds.), El Ecosistema Marino. Mar del Plata: Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero INIDEP, p.169.
- Carreto, J. I., Montoya, N. G., Akselman, R., Carignan, M. O., Silva, R. I., Cucchi Colleoni, A.D., 2008. Algal pigment patterns and phytoplankton assemblages in different water masses of the Río de la Plata maritime front. *Cont. Shelf. Res.* 28, 1589–1606.
- Carreto, J. I., Montoya, N. G., Carignan, M. O., Akselman, R., Acha, E. M., Derisio, C. 2016. Environmental and biological factors controlling the spring phytoplankton bloom at the Patagonian shelf-break front: degraded fucoxanthin pigments and the importance of microzooplankton grazing. *Prog. Oceanogr.* 146, 1–21.
- Cassidy, D., 2005. The effect of harmful algae on the summer mortality of juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). Master of Science Thesis, University of British Columbia, pp. 1–73.
- Catterall, W. A., Morrow, C. S., Hartshorne, R. P., 1979. Neurotoxin binding to receptor sites associated with voltage-sensitive sodium channels in intact, lysed, and detergent-solubilized brain membranes. *J. Biol. Chem.* 254(22), 11379–11387.
- Cembella, A. D., Sullivan, J. J., Boyer, G. L., Taylor, F. J. R., Andersen, R. J., 1987. Variation in paralytic shellfish toxin composition within the *Protogonyaulax tamarensis/catenella* species complex; red tide dinoflagellates. *Biochem. Syst. Ecol.* 15, 171–186.
- Cembella, A. D., Quilliam, M. A., Lewis, N. I., 2000. The marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) as the causative organism of spirolide shellfish toxins. *Phycologia* 39, 67–74.

- Cembella, A. D., Bauder, A. G., Lewis, N. I., Quilliam, M. A., 2001. Association of the gonyaulacoid dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* with spirolide toxins in size-fractionated plankton. *J. Plankton Res.* 23 (12), 1413–1419.
- Cembella A. D., John U., 2006. Molecular physiology of toxin production and growth regulation in harmful algae. En: Granéli E, Turner J. T. (Eds.), *Ecology of Harmful Algae*. Springer Berlin Heidelberg, 189, 215–227.
- Chapelle A., Le Gac M., Labry C., Siano R., Quere J., Caradec F., Le Bec C., Nezan E., Doner A. & Gouriou J. 2015. The Bay of Brest (France), a new risky site for toxic *Alexandrium minutum* bloom and PSP shellfish contamination. *Harmful Algae News* 51, 4–5.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Boschetti, L., Rubini, S., Cangini, M., Pigozzi, S., Poletti, R., 2010. Complex toxin profile of *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea revealed by LC-MS. *Toxicon* 55, 280–288.
- Claparède, E., Lachmann, J., 1858/1859. Etude sur les infusoires et les rhizopodes. Mém. Inst. Genevois 5–6, 489 pp., 13 pl.
- Clément, A., Lembeye, G., Lassus, P., Le Baut, C., 1994. Bloom superficial no tóxico de *Dinophysis* cf. *acuminata* en el estero de Reloncaví. XIV Jornadas de Ciencias del Mar y I Jornada Chilena de Salmonicultura, 23-25 de mayo de 1994. Resúmenes, p. 83.
- Clément, A., Lincoqueo, L., Saldivia, M., Brito, C. G., Muñoz, F., Fernandez, C., Perez, F., Maluje, C. P., Correa Serra Martins Silva, N., Moncada, V., Contreras, G., 2016. Climatic anomalies and harmful flagellates blooms in Southern Chile. En: ICHA Abstract book, Florianópolis Sata. Catarina, Brasil, p. 73.
- Cloern, J. E., Schraga, T. S., Lopez, C. B., Knowles, N., Labiosa, R. G., Dugdale, R., 2005. Climate anomalies generate an exceptional dinoflagellate bloom in San Francisco Bay. *Geophys. Res. Lett.* 32, L14608.
- Cusick, K. D., Sayler, G. S., 2013. An overview on the marine neurotoxin, saxitoxin: Genetics, molecular targets, methods of detection and ecological functions. *Mar. drugs* 11(4), 991–1018.
- D'Agostino, V. C., Hoffmeyer, M. S., Almandoz, G. O., Sastre, V., Degradi, M., 2015. Potentially toxic *Pseudo-nitzschia* species in plankton and fecal samples of *Eubalaena australis* from Península Valdés calving ground, Argentina. *J. Sea Res.* 106, 39–43.
- Dale B, M., Edwards, C., Reid P., 2003. Climate change and harmful Algal Blooms. In Granéli, E., J. T. Turner (Eds.). *Ecology of Harmful Algae* 1-413, Springer Berlin. ISBN978-3-540-74009-4.
- Daniels, C. J., Poulton, A. J., Esposito, M., Paulsen, M. L., Bellerby, R., St. John, M., Martin, A. P., 2015. Phytoplankton dynamics in contrasting early stage North Atlantic spring blooms: composition, succession, and potential drivers. *Biogeosciences Discussions* 12, 93–133.
- Daugbjerg, N., Hansen, G., Larsen, J., Moestrup, Ø, 2000. Phylogeny of some of the major genera of dinoflagellates based on ultrastructure and partial LSU rDNA sequence data, including the erection of three new genera of unarmoured dinoflagellates. *Phycologia* 39, 302.
- Davison, P. & Yentsch, C.M. 1985. Occurrence of toxic dinoflagellates and shellfish toxin along coastal Uruguay, South America. En: Anderson, D. M., White, A. W., Baden, D. G. (Eds.) *Toxic Dinoflagellates*. Elsevier, NY, pp. 153–157.

- De la Rosa, L. A., Alfonso, A., Vilariño, N., Vieytes, M. R., Botana, L. M., 2001. Modulation of cytosolic calcium levels of human lymphocytes by yessotoxin, a novel marine phycotoxin. *Biochem. Pharmacol.* 61, 827–833.
- Delgado A. L., Loisel H., Jamet C., Vantrepotte V., Perillo G. M. E., Piccolo M. C. Seasonal and inter-annual analysis of chlorophyll-a and inherent optical properties from satellite observations in the inner and mid-shelves of the south of Buenos Aires Province (Argentina). *Remote Sens.* 7, 11821–47.
- Denardou-Queneherve, D., Grzebyk, D., Pouchus, Y. F., Sauviat, M. P., Alliot, E., Biard, J. F., Berland, B., Verbist, J. F., 1999. Toxicity of French strains of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* experimental and natural contaminations of mussels. *Toxicon* 37, 1711–1719.
- Dodge, J. D., 1989: Some revisions of the family Gonyaulaceae (Dinophyceae) based on a scanning electron microscope study. *Bot. Mar.* 32, 275–298.
- Dominguez, H. J., Paz, B., Daranas, A. H., Norte, M., Franco, J. M., Fernández, J. J., 2010. Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectenotoxin and okadaic acid toxin groups: characterization, analysis and human health implications. *Toxicon* 56, 191–217.
- Draisci, R., Ferretti, E., Palleschi, L., Marchiafava, C., Poletti, R., Milandri, A., Ceredi, A., Pompei, M., 1999. High levels of yessotoxin on mussels and presence of yessotoxin and homo-yessotoxin in dinoflagellates of the Adriatic Sea. *Toxicon* 37, 1187–1193.
- Edvardsen, B., Shalchian-Tabrizi, K., Jakobsen, K. S., Medlin, L. K., Dahl, E., Brubak, S., Paasche, E., 2003. Genetic variability and molecular phylogeny of *Dinophysis* species (Dinophyceae) from Norwegian waters inferred from single cell analyses of rDNA. *J. Phycol.* 39, 395–408.
- Elbusto, C. A., Ballabene A. C., Campero C. M., Ramirez E. E., Villanueva C. R., 1981. Toxina Paralizante de los moluscos del mar argentino. *Acta Bioquim. Clin. Latinoam.* 15, 447–456.
- Elferink, S., Neuhaus, S., Wohlrab, S., Toebe, K., Voß, D., Gottschling, M., Lundholm, N., Krock, B., Koch, B., Zielinski, O., Cembella, A., John, U., 2016. Molecular diversity patterns among various phytoplankton size-fractions in West Greenland in late summer. *Deep Sea Res. I: Oceanographic Research Papers* 121, 64–67.
- Ellegard, M., Daugbjerg, N., Rochon, A., Lewis, J., Harding, I., 2003. Morphological and LSU rDNA sequence variation within the *Gonyaulax spinifera*-*Spiniferites* group (Dinophyceae) and proposal of *G. elongata* comb. Nov. and *G. membranacea* comb. Nov. *Phycologia* 42, 151–164.
- Enevoldsen, H.O. & A. Aguilera, 2002. Organizaciones internacionales y regionales relacionadas con programas y actividades sobre Floraciones Algales Nocivas. En: Sar E.A., M.E. Ferrario & B. Reguera (Eds.), Microalgas marinas productoras de toxinas presentes en el Cono Sur Americano: 291-305. Instituto Español de Oceanografía. Madrid. ISBN 84-95877-01-5.
- Esteves, J. L., Santinelli, N., Sastre, V., Diaz, R., Rivas, O., 1992. A toxic dinoflagellate bloom and PSP production associated with upwelling in Golfo Nuevo, Patagonia Argentina. *Hydrobiologia* 242, 115–122.
- Fabro, E., Almandoz, G. O., Ferrario, M. E., Hoffmeyer, M. S., Pettigrosso, R. E., Uibrig, R., Krock, B., 2015. Co-occurrence of *Dinophysis tripos* and pectenotoxins in Argentinean shelf waters. *Harmful Algae* 42, 25–33.

- Falkowski, P. G., 1994. The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. *Photosynth. Res.* 39: 235–258.
- Fernández, L. & Brandini, F., 1999. Microplankton communities in the Southwestern Atlantic Ocean: biomass and distribution in November/1992. *Rev. bras. oceanogr.* 47, 189–205.
- Fernández, M. L., Reguera, B., González-Gil, S., Míguez, A., 2006. Pectenotoxin-2 in single-cell isolates of *Dinophysis caudata* and *Dinophysis acuta* from the Galician Rias (NW Spain). *Toxicon* 48, 477–490.
- Ferrario, M. E., Sar E. A., Sala, S. E., 1995: Metodología básica para el estudio del fitoplancton con especial referencia a las diatomeas. En: Alveal, K., Ferrario, M. E., De Oliveira, E.C., Sar, E. (Eds): Manual de Métodos Ficológicos: 1-23. Universidad de Concepción, Editora A. Pinto, Chile.
- Figuerola, R. I. & Bravo, I., 2005. Sexual reproduction and two different encystment strategies of *Lingulodinium polyedrum* (Dinophyceae) in culture. *J. Phycol.* 41, 370–9.
- Figuerola, R. I., Bravo, I., Garcés, E., 2006. Multiple routes of sexuality in *Alexandrium taylori* (Dinophyceae) in culture. *J. Phycol.* 42 (5), 1028–1039.
- Figuerola, R. I., Bravo, I., Garcés, E., 2008. The significance of sexual versus asexual cyst formation in the life cycle of the noxious dinoflagellate *Alexandrium peruvianum*. *Harmful Algae* 7, 653–663.
- Fraga, S., Sampedro, N., Larsen, J., Moestrup, Ø., Calado, A. J., 2015. Arguments against the proposal 2302 by John & al. to reject the name *Gonyaulax catenella* (*Alexandrium catenella*). *Taxon* 64, 634–635.
- Franco, J. M., Fernandez, P., Reguera, B., 1994. Toxin profiles of natural-populations and cultures of *Alexandrium minutum* Halim from Galician (Spain) coastal waters. *J. Appl. Phycol.* 6, 275–279.
- Franco, J. M., Paz, B., Riobó, P., Pizarro, G., Figuerola, R., Fraga, S. & Bravo, I., 2006. First report of the production of spirolides by *Alexandrium peruvianum* (Dinophyceae) from the Mediterranean Sea. En: 12th International Conference on Harmful Algae, Copenhagen, Denmark, Programme and Abstracts, 174–175.
- Freudenthal, A. R., Jijina, J., 1985. Shellfish poisoning episodes involving or coincidental with dinoflagellates. En: Anderson, D. M., White, A., Baden, D. (Eds.), Toxic Dinoflagellates. Elsevier, New York, pp. 461–466.
- Fritz, L. & Triemer, R. E., 1985. A rapid simple technique utilizing Calcofluor white M2R for the visualization of dinoflagellate thecal plates. *J. Phycol.* 21, 662–664.
- Fux, E., Smith, J. L., Tong, M., Guzmán, L., Anderson, D. M., 2011. Toxin profiles of five geographical isolates of *Dinophysis* spp. from North and South America. *Toxicon* 57, 275–287.
- Gagliardini, D. A. & Rivas, A. L., 2004. Environmental characteristic of San Matías Gulf obtained from LANDSAT-TM and ETM+ data. *Gayana (Concepción)* 68, 186–193.
- Galluzzi, L., Bertozzini, E., Penna, A., Perini, F., Garcés, E., Magnani, M., 2010. Analysis of rRNA gene content in the Mediterranean dinoflagellate *Alexandrium catenella* and *Alexandrium taylori*: implications for the quantitative real-time PCR-based monitoring methods. *J. Appl. Phycol.* 22, 1–9.

- García, V. M. T., García, C. A. E., Mata, M. M., Pollery, R. C., Piola, A. R., Signorini, S. R., McClain, C. R., Iglesias-Rodriguez, M. D., 2008. Environmental factors controlling the phytoplankton blooms at the Patagonian Shelf-break in spring. *DeepSea Res. I* 55 (9), 1150–1166.
- García, C. A. E., García, V. M. T., Dogliotti, A. I., Ferreira, A., Romero, S. I., Mannino, A., Souza, M. S., Mata, M. M., 2011. Environmental conditions and bio-optical signature of a coccolithophore bloom in the Patagonian shelf. *J. Geophys. Res.* 116, C03025, <http://dx.doi.org/10.1029/2010JC006595>
- Garibotti, I. A.; Ferrario, M. E.; Almandoz, G. O.; Castanos, C., 2011. Seasonal diatom cycle in Anegada Bay, El Rincon estuarine system, Argentina. *Diatom Res.*, 26, 227–241.
- Gates, J. A. & Wilson, W. B., 1960. The toxicity of *Gonyaulax monilata* Howell to *Mugil cephalus*. *Limnol. Oceanogr.* 5, 171–174.
- Gayoso, A. M., Dover, S., Morton, S., Busman, M., Moeller, P., Fulco, V. K., Maranda, L., 2002. Diarrhetic shellfish poisoning associated with *Prorocentrum lima* (Dinophyceae) in Patagonian Gulfs (Argentina). *J. Shellfish Res.* 21, 461–463.
- Gayoso A. M. & Fulco K., 2006. Occurrence patterns of *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech populations in the Golfo Nuevo (Patagonia, Argentina), with observations on ventral pore occurrence in natural and cultured cells. *Harmful Algae* 5, 233–241.
- Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, 2002. No. 165. Italian Ministry Decree (Decreto Ministeriale) dated May 16, 2002, 16–19.
- Gerssen, A., Pol-Hofstad, I. E., Poelman, M., Mulder, P. P., Van den Top, H. J., De Boer, J., 2010. Marine toxins: chemistry, toxicity, occurrence and detection, with special reference to the Dutch situation. *Toxins* 2, 878e904.
- Giacobbe, M. G., Oliva, F. D., Maimone, G., 1996. Environmental factors and seasonal occurrence of the dinoflagellate *Alexandrium minutum*, a PSP potential producer, in a Mediterranean lagoon. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 42:539–549.
- Gómez, F., Moreira, D., López-García, P., 2011a. Avances en el estudio de los dinoflagelados (Dinophyceae) con la filogenia molecular. *Hidrobiológica* 21(3), 343–364.
- Gómez, M., I, Piola, A. M. R., Kattner, G., Alder, V.A., 2011b. Biomass of autotrophic dinoflagellates under weak vertical stratification and contrasting chlorophyll levels in subantarctic shelf waters. *J Plankton Res* 33, 1304–1310
- Gómez, F., López-García, P., Moreira, D., 2011c. Molecular phylogeny of dinophysoid dinoflagellates: the systematic position of *Oxyphysis oxytoxoides* and the *Dinophysis hastata* group (Dinophysales, Dinophyceae). *J Phycol* 47, 393–406.
- González-Gil, S., Pizarro, G., Paz, B., Velo-Suárez, L., Reguera, B., 2011. Considerations on the toxigenic nature and prey sources of *Phalacroma rotundatum*. *Aquat. Microb. Ecol.* 64, 197–203.
- Gracia Villalobos, L., Santinelli, N., Sastre, V., Krock, B., Esteves, J. L., 2015. *Dinophysis* species associated with Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) episodes in North Patagonian gulfs (Chubut, Argentina). *J. Shellfish Res.* 34, 1141–1149.
- Graham, L. E., Wilcox, L. W., 2000. *Algae*. Prentice-Hall, Upper Saddle River, 640 pp.
- Granéli, E., Turner, J. T., 2006. *Ecology of Harmful Algae*. Springer, Berlin.

- Grindley, J. R., Nel, E. A., 1970. Red water and mussel poisoning at Elands Bay, December 1966. *Fish. Bull.* 6, 36–55.
- Groben, R., John, U., Eller, G., Lange, M., Medlin, L. K., 2004. Using fluorescently-labelled rRNA probes for hierarchical estimation of phytoplankton diversity—a mini-review. *Nova Hedwigia* 79, 313–320.
- Grzebyk, D., Denardou, A., Berland, B., Pouchus, Y. F., 1997. Evidence of a new toxin in the red-tide dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *J. Plankton Res.* 19, 1111–1124.
- Gu, H., Luo, Z., Krock, B., Witt, M., Tillmann, U., 2013. Morphology, phylogeny and azaspiracid profile of *Azadinium poporum* (Dinophyceae) from the China Sea. *Harmful Algae* 21, 64–75.
- Guéret, S. M. & Brimble, M. A., 2010. Spiroimine shellfish poisoning (SSP) and the spirolide family of shellfish toxins: Isolation, structure, biological activity and synthesis. *Natural product reports* 27, 1350–1366.
- Guerrero, R. A., Piola, A. R., 1997. Masas de agua en la plataforma continental. In: Boschi, E. (Ed.), El Mar Argentino y sus Recursos Pesquero, Tomo I: Antecedentes históricos de las exploraciones en el mar y las características ambientales. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, INIDEP. Mar del Plata, Argentina, pp. 107–119.
- Guinder, V. A., J. C. Molinero, C. A. Popovich, J. E. Marcovecchio, U. Sommer, 2012. Dominance of the planktonic diatom *Thalassiosira minima* in recent summers in the Bahía Blanca Estuary, Argentina. *J. Plankton Res.* 34(11): 995–1000
- Guzmán L, Pacheco H, Pizarro G, Alarcón, C., 2002. *Alexandrium catenella* y veneno paralizante de los mariscos en Chile. En: Sar E. A., Ferrario M. E., Reguera, B. (Eds), Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano. Instituto Español Oceanográfico de Madrid, Vigo, pp. 235–256.
- Hallegraeff, G. M., 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, 32(2), 79-99.
- Hallegraeff, G. M., 1995. Harmful algal blooms: A global overview. En: Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M., Cembella, D. (Eds.), Manual of Harmful Marine Microalgae. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 1-22
- Hallegraeff, G. M., 2004. Harmful algal blooms: A global overview. In: Manual of Harmful marine microalgae. (Hallegraeff, G. M.; Anderson, D. M. & Cembella, A. D., eds.): 25-49. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.
- Hallegraeff, G. M., 2010. Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: A formidable predictive challenge. *J. Phycol.* 46, 220–235.
- Hansen, G., Moestrup, O., Roberts, K.R., 1996/1997. Light and electron microscopical observations on *Protoceratium reticulatum* (Dinophyceae). *Arch. Protistenk.* 147, 381–391.
- Hansen, G., Daugbjerg, N., Franco, J. M., 2003. Morphology, toxin composition and LSU rDNA phylogeny of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) from Denmark, with some morphological observations on other European strains. *Harmful Algae* 2, 317–335.
- Harju, K., Koskela, H., Kremp, A., Suikkanen, S., de la Iglesia, P., Miles, C. O., Krock, B., Vanninen, P., 2016. Identification of gymnodimine D and presence of gymnodimine variants in the dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* from the Baltic Sea. *Toxicon*, 112:68–76.

- Hattenrath-Lehmann, T. & Gobler, C. J. 2015. T. The contribution of inorganic and organic nutrients to the growth of a North American isolate of the mixotrophic dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. *Limnol. Oceanogr.* 60, 1588–1603
- Heil C. A., Glibert P. M., Fan C., 2005. *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller. A review of a harmful algal bloom species of growing worldwide importance. *Harmful Algae* 4, 449–470.
- Hess, P., McCarron, P., Krock, B., Kilcoyne, J., Miles, C. O., 2014a. Azaspiracids: chemistry, biosynthesis, metabolism and detection. En: Botana, L. M. (Ed.), *Seafood and Freshwater Toxins*. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 799–821.
- Hess, P., Twiner, M. J., Kilcoyne, J., Sosa, S., 2014b. Azaspiracid toxins: toxicological profile. *Marine and freshwater toxins: marine and freshwater toxins*, 1-19.
- Ho, K. C., Kang, S. H., Lam, I. H. Y., Hodgkiss, I. J., 2003. Distribution of *Alexandrium tamarense* in Drake Passage and the threat of harmful algal blooms in the Antarctic Ocean. *Ocean Polar Res.* 25, 625–631.
- Ho, K. C., Lee T. C. H., Kwok, O. T., Lee, F. W. F., 2012. Phylogenetic analysis on a strain of *Alexandrium tamarense* collected from Antarctic Ocean. *Harmful Algae* 15, 100–108.
- Hoagland, P., Scatasta, S. 2006. The Economic Effects of Harmful Algal Blooms. In: Granéli, E., Turner, J. T., Caldwell, M. M., Heldmaier, G., Lange, O. L., Mooney, H. A., Schulze, E. D., Sommer, U., (Eds.), *Ecology of Harmful Algae*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 391–402.
- Horstman, D. A., 1981. Reported red-water outbreaks and their effects on fauna of the west and south coasts of South Africa, 1959–1980. *Fish. Bull. S. Afr.* 15, pp. 71–88.
- Houghton, C., Hernando, M. P., Malanga, G., Krock, B., Tillmann, U., 2016. Temperature effects on growth, yessotoxin content, and oxidative stress of *Protoceratium reticulatum* from Argentina (South Atlantic Ocean). En: ICHA Abstract book, Florianópolis Sata. Catarina, Brasil, p. 116.
- Hsia, M. H., Morton, S. L., Smith, L. L., Beauchesne, K. R., Huncik, K. M., Moeller, P. D. R., 2005. Production of goniodomin A by the planktonic, chain-forming dinoflagellate *Alexandrium monilatum* (Howell) Balech isolated from the Gulf Coast of the United States. *Harmful Algae* 4, 287–295.
- Hu, T., Curtis, J. M., Oshima, Y., Quilliam, M. A., Walter, J. A., Watson-Wright, W. M., Wright, J. L. C., 1995. Spirolides B and D, two novel macrocycles isolated from the digestive glands of shellfish. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 20, 2159–2161.
- ICES, 2006. Report on the ICES/IOC workshop on new and classic techniques for the determination of numerical abundance and biovolume of HAB species – evaluation of the cost, time-efficiency and intercalibration methods (WKNCT), 22-27 August 2005, Kristineberg, Sweden. ICES CM 2005/C:10.
- James, K. J., Moroney, C., Roden, C., Satake, M., Yasumoto, T., Lehane, M., Furey, A., 2003a. Ubiquitous “benign” alga emerges as the cause of shellfish contamination responsible for the human toxic syndrome, azaspiracid poisoning. *Toxicon* 41, 145–154.

- James, K. J., Sierra, M. D., Lehane, M., Braña Magdalena, A., Furey, A., 2003b. Detection of five new hydroxyl analogues of azaspiracids in shellfish using multiple tandem mass spectrometry. *Toxicon* 41, 277–283.
- Jansen, S., Riser, C.W., Wassmann, P., Bathmann, U., 2006. Copepod feeding behaviour and egg production during a dinoflagellate bloom in the North Sea. *Harmful Algae* 5, 102–112.
- Jensen, M. A. & Daugbjerg, N., 2009. Molecular phylogeny of selected species of the order Dinophysiales (Dinophyceae) testing the hypothesis of a Dinophysioid radiation. *J. Phycol.* 45, 1136–1152.
- Jephson, T. & Carlsson, P., 2009. Species and stratification dependent diel vertical migration behaviour of three dinoflagellate species in a laboratory study. *J. Plank. Res.* 31, 1353–1362.
- Jiang, X. D., Lonsdale, D. J., Gobler, C. J., 2010. Grazers and vitamins shape chain formation in a bloom-forming dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides*. *Oecologia* 164, 455–464.
- Johansen, M. & Rundberget, T., 2006. The sampling technique greatly affects the toxin content in *Dinophysis* spp. cells. Programme and Abstracts of the XII International Conference on Harmful Algae, Copenhagen, p. 200. www.bi.ku.dk/hab/docs/P&A_Book.pdf
- John, U., Quilliam, M. A., Medlin, L., Cembella, A. D., 2001. Spirolide production and photoperiod-dependent growth of the marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. Hallegraeff, G. M., Blackburn S. I., Bolch C. J., Lewis R. J. (Eds.), Harmful Algal Blooms 2000. Proceedings of the 9th International Conference on Harmful Algal Blooms, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, 299–302.
- John, U., Fensome, R. A. & Medlin, L. K., 2003. The application of molecular clock based on molecular sequences and the fossil record to explain biogeographic distributions within the *Alexandrium tamarense* “species complex” (Dinophyceae). *Mol. Biol. Evol.* 20, 1015– 1027.
- John, U., Medlin, L. K., Groben, R., 2005. Development of specific rRNA probes to distinguish between geographic clades of the *Alexandrium tamarense* species complex. *J. Plank. Res.* 27 (2), 199–204.
- John, U., Litaker, R. W., Montresor, M., Murray, S., Brosnahan, M. L., Anderson, D. M., 2014. Formal revision of the *Alexandrium tamarense* species complex (Dinophyceae) taxonomy: the introduction of five species with emphasis on molecular-based (rDNA) classification. *Protist* 165, 779–804.
- Jørgensen, K. & Andersen, P., 2007. Relation between the concentration of *Dinophysis acuminata* and Diarrheic Shellfish Poisoning toxins in blue mussels (*Mytilus edulis*) during a toxic episode in the Limfjord (Denmark). *J. Shellfish Res.* 26, 1081–1087.
- Kamiyama, T., Nagai S., Suzuki T., Miyamura K., 2010. Effect of temperature on production of okadaic acid, dinophysistoxin-1, and pectenotoxin-2 by *Dinophysis acuminata* in culture experiments. *Aquatic Microbial Ecol.* 60, 193–202.
- Kat, M., 1979. The occurrence of *Prorocentrum* species and coincidental gastroenteritis illness of mussels consumers. En: Taylor, D. L., Seliger, H. H., (Eds.), Toxic Dinoflagellate Blooms: Proceedings of the Second International Conference on Toxic Dinoflagellate Blooms; Elsevier, North-Holland, New York, USA, pp. 215–220.

- Kat, M., 1985. *Dinophysis acuminata* blooms, the distinct cause of Dutch mussel poisoning. En: Anderson, D.M., White, A., Baden, D. (Eds.), Toxic Dinoflagellates. Elsevier, New York, pp. 73–77.
- Kharrat, R., Servent, D., Girard, E., Ouanounou, G., Amar, M., Marrouchi, R., Benoit, E., Molgó, J., 2008. The marine phycotoxin gymnodimine targets muscular and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes with high affinity. *J. Neurochem.* 107, 952–963.
- Kim, K. Y., Yoshida, M., Fukuyo, Y., Kim, C. H., 2002. Morphological observation of *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech, *A. catenella* (Whedon et Kofoid) Balech and one related morphotype (Dinophyceae) in Korea. *Algae* 17, 11–19.
- Kim, S., Kang, Y. G., Kim, Y.G., Yih, W., Coats, D. W., Park, M.G., 2008. Growth and grazing responses of the mixotrophic dinoflagellate *Dinophysis acuminata* as functions of light intensity and prey concentration. *Aquatic Microbial Ecol.* 51, 301–310.
- Koike, K., Horie, Y., Suzuki, T., Kobiyama, A., Kurihara, K., Takagi, K., Kaga, S. N. & Oshima, Y., 2006: *Protoceratium reticulatum* in northern Japan: environmental factors associated with seasonal occurrence and related contamination of yessotoxin in scallops. *J. Plankton Res.* 28, 103–112.
- Konishi, M., Yang, X., Li, B., Fairchild, C. R., Shimizu, Y., 2004. Highly cytotoxic metabolites from the culture supernatant of the temperate dinoflagellate *Protoceratium cf. reticulatum*. *J. Nat. Prod.*, 67, 1309–1313.
- Korringa, P. and Roskam, R. T., 1961. An Unusual Case of Mussel Poisoning. C.M./Shellfish Committee, International Council for the Exploration of the Sea: Copenhagen, Denmark, pp. 2.
- Kraberg, A., Bauman, M., Dieter C., 2010. Coastal phytoplankton. Munchen.
- Kremp, A., Tahvanainen, P., Litaker, W., Krock, B., Suikkanen, S., Leaw, C. P., Tomas, C., 2013. Phylogenetic relationships, morphological variation, and toxin patterns in the *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) complex: implications for species boundaries and identities. *J. Phycol.* 50, 81–100.
- Krock, B., Seguel, C. G. & Cembella, A. D. 2007. Toxin profile of *Alexandrium catenella* from the Chilean coast as determined by liquid chromatography with fluorescence detection and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Harmful Algae* 6, 734–44.
- Krock B, Tillmann U, Selwood A, Cembella A. 2008a. Unambiguous identification of pectenotoxin-1 and distribution of pectenotoxins in plankton from the North Sea. *Toxicon* 52, 927–935.
- Krock B., Tillmann U., John U., Cembella, A. D., 2008b. LCMS/MS on board ship: tandem mass spectrometry in the search for phycotoxins and novel toxigenic plankton from the North Sea. *Anal. and Bioanal. Chem.* 392, 797–803.
- Krock, B., Seguel, C. G., Valderrama, K., Tillmann, U., 2009a. Pectenotoxins and yessotoxin from Arica Bay, north Chile as determined by tandem mass spectrometry. *Toxicon* 54, 364–367
- Krock B., Tillmann U., John U., Cembella A. D., 2009b. Characterization of azaspiracids in plankton size-fractions and isolation of an azaspiracid-producing dinoflagellate from the North Sea. *Harmful Algae* 8, 254–263.

- Krock, B., Tillmann, U., Voß, D., Koch, B. P., Salas, R., Witt, M., Potvin, E., Jeong, H. J., 2012. New azaspiracids in Amphidomataceae (Dinophyceae). *Toxicon* 60, 830–839.
- Krock B., Borel C. M., Barrera F., Tillmann U., Fabro E., Almandoz G. O., Ferrario, M. E., Garzón Cardona J. E., Koch B. P., Alonso C., Lara R., 2015. Analysis of the hydrographic conditions and cyst beds in the San Jorge Gulf, Argentina, that favor dinoflagellate population development including toxigenic species and their toxins. *J. Mar. Syst.* 148, 86–100.
- Lam, C. W. Y. & Ho K. C., 1989. Red tides in Tolo Harbour, Hong Kong, En Okaichi, T. Anderson D. M., and Nemoto T. (Eds), *Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology*. Elsevier, New York, pp. 49–52.
- Langeland, G., Hasselgaard, T., Tangen, K., Skulberg, O.M., Hjelle, A., 1984. An outbreak of paralytic shellfish poisoning in western Norway. *Sarsia* 69, 185–193.
- Lassus, N., Chomérat, E. Nézan, P. Hess, 2016. Toxic and harmful microalgae of the World Ocean. *Micro-algues toxiques et nuisibles de l’océan mondial*. IOC Manuals and Guides 68 (English/French), Intl. Society for the Study of Harmful Algae (ISSHA) / Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO (IOC), Copenhagen, Denmark, 523 pp.
- Leaw, C. P., Lim, P. T., Ng, B. K., Cheah, M. Y., Ahmad, A., Usup, G., 2005. Phylogenetic analysis of *Alexandrium* species and *Pyrodinium bahamense* (Dinophyceae) based on theca morphology and nuclear ribosomal gene sequence. *Phycologia* 44, 550–565.
- Lee, J. S., Igarashi, T., Fraga, S., Dahl, E., Hovgaard, P., 1989. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *J. Appl. Phycol.* 1, 147–152.
- LeGresley, M. & McDermott, G., 2010. Counting chamber methods for quantitative phytoplankton analysis-haemocytometer, Palmer-Maloney cell and Sedgewick-Rafter cell. En: Karlson, B., Cusack, C., Bresnan, E. (Eds), *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. UNESCO, Paris, pp. 25–30.
- Lewis, J., Rochon, A., Harding, I., 1999. Preliminary observations of cyst-theca relationships in *Spiniferites ramosus* and *Spiniferites membranaceus* (Dinophyceae). *Grana* 38, 113–124.
- Lilly, E. L., Halanych, K. M., Anderson, D. M., 2005. Phylogeny, biogeography, and species boundaries within the *Alexandrium minutum* group. *Harmful Algae* 4, 1004–1020.
- Lilly, E. L., Halanich, K. M., Anderson, D. M., 2007. Species boundaries and global biogeography of the *Alexandrium tamarense* complex (dinophyceae). *J. Phycol.* 43, 1329–1338.
- López-Rivera A., O’Callaghan K., Moriarty, M., O’Driscoll D., Hamilton, B., Lehane, M., James, K.J., Furey, A., 2009. First evidence of azaspiracids (AZAs): A family of lipophilic polyethermarine toxins in scallops (*Argopecten purpuratus*) and mussels (*Mytilus chilensis*) collected in two regions of Chile. *Toxicon* 55, 692–701.
- Luckas, B., Hummert, C., Oshima, Y., 2003. Analytical methods for paralytic shellfish poisons. En: Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M., Cembella, A. D. (Eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. UNESCO, Paris, pp. 191–209.
- Luo, Z., Krock, B., Mertens, K. N., Nézan, E., Chomérat, N., Bilien, G., Tillmann, U., Gu, H., 2017. Adding new pieces to the *Azadinium* (Dinophyceae) diversity and biogeography puzzle: non-toxicogenic *Azadinium zhuanum* sp. nov. from China, toxicogenic *A. poporum* from the

- Mediterranean, and a non-toxicogenic *A. dalianense* from the French Atlantic. *Harmful Algae* 66, 65–78.
- Lush, G., Negri, A. P., Hallegraeff, G. M., 2001. Production of exotoxins by *Alexandrium minutum*. En: Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J.S., Lewis, R. (Eds.), *Harmful Algal Blooms 2000*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 268–271.
- Lutz, V., Segura, V., Dogliotti, A., Gagliardini, D., Bianchi, A., Balestrini, C., 2010. Primary production in the Argentine Sea during spring estimated by field and satellite models *J. Pla.Res.* 32, 181–195
- Mackenzie, L., White, D., Oshima, Y., Kapa, J., 1996. The resting cyst of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) in New Zealand. *Phycologia* 35 (2), 148–155.
- MacKenzie, L. & Berkett, N., 1997. Cell morphology and PSP-toxin profiles of *Alexandrium minutum* in the Marlborough Sounds, New Zealand. *N. Z. J. Mar. Freshwater Res.* 31, 403–409.
- MacKenzie, L., Truman, P., Satake, M., Yasumoto, T., Adamson, J., Mountfort, D., White, D., 1998. Dinoflagellate blooms and associated DSP-toxicity in shellfish in New Zealand. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Microalgae*. IOC-UNESCO, pp. 74–77.
- MacKenzie, L., Selwood, A. I., Marshall, C., 2012. Isolation and characterization of an enzyme from the Greenshell mussel *Perna canaliculus* that hydrolyses pectenotoxins and esters of okadaic acid. *Toxicon* 60, 406–419.
- MacLean, J. L., 1989. Indo-Pacific red tides, 1985–1988. *Mar. Pollution Bull.*, 20(7), 304–310.
- Maneiro, I., Frangópulos, M., Guisande, C., Fernández, M., Reguera, B., Riveiro, I., 2000. Zooplankton as a potential vector of diarrhetic shellfish poisoning toxins through the food web. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 201, 155–163.
- Manger, R. L., Leja, L. S., Lee, S. Y., Hungerford, J. M., Wekell, M. M., 1993. Tetrazolium-based cell bioassay for neurotoxins active on voltage-sensitive sodium channels: semiautomated assay for saxitoxins, brevetoxins, and ciguatoxins. *Analytical Biochemistry* 214(1), 190–194.
- Marcaillou-Le Baut, C., Krys, S. and Bourdeau, P., 2001, Syndromes Observés Et Données Épidémiologiques. En: *Toxines D’algues Dans L’alimentation*, J. M. Frémy and P. Lassus, Ifremer, pp. 371–399.
- Marcaillou, C., Mondeguer, F., Gentien, P., 2005. Contribution to toxicity assessment of *Dinophysis acuminata* (Dinophyceae). *J. Appl. Phycol.* 17, 155–160.
- Martínez, A., & Ortega, L. Comunidades fitoplanctónicas al NE de la Zona Común de Pesca Argentino-Uruguay.
- Marrari, M., Piola, A. R., Valla, D. 2017. Variability and 20-year Trends in Satellite-Derived Surface Chlorophyll Concentrations in Large Marine Ecosystems around South and Western Central America. *Fronti. Mar. Sci.* 4, 372.
- Matsuoka, K., Cho, H. J., Jacobson, D. M., 2000. Observation of the feeding behaviour and growth rates of the heterotrophic dinoflagellate *Polykrikos kofoidii* (Polykrikaceae, Dinophyceae). *Phycologia* 39, 82–86.
- McMahon, T., Silke, J., 1996. West coast of Ireland; winter toxicity of unknown aetiology in mussels. *Harmful Algae News* 14, 2.

- Medhioub, W., Sechet, V., Truquet, P., Bardouil, M., Amzil, Z., Lassus, P. & Soudant, P. 2011. *Alexandrium ostenfeldii* growth and spirolide production in batch culture and photobioreactor. *Harmful Algae* 10, 794–803.
- Méndez, S. 1993. *Alexandrium fraterculus* in Uruguayan waters. *Harmful Algae News* 5, 3.
- Méndez, S., Severov, D., Ferrari, G., Mesones, C., 1996. Early spring *Alexandrium tamarense* toxic blooms in the Uruguayan waters. En: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 113–116.
- Méndez, S., Calicchio, S. M., Kulis, D. M., Anderson, D. M., 2000. PSP toxin production of Uruguayan isolates of *Gymnodinium catenatum* and *Alexandrium tamarense*. Harmful algal blooms 2000. En: Hallegraeff, G., Blackburn, S., Lewis R., Bolch, C. (Eds.), Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 352–355.
- Menezes, M., Branco, S., Proença, L. A. O., Schramm, M. A., 2007. Brazil. Bloom of *Alexandrium minutum* Halim on Rio de Janeiro coast: occurrence and toxicity. *Harmful algae news* 34, 7–9.
- Menezes, M., Varela, D., de Oliveira Proença, L. A., da Silva Tamanaha, M., Paredes, J., 2010. Identification of the toxic algae *Alexandrium tamiyavanichi* (Dinophyceae) from northeastern Brazil: a combined morphological and rDNA sequence (partial LSU and ITS) approach. *J. Phycol.* 46(6), 1239–1251.
- Meyer-Harms, B. & Pollenhe, F., 1998. Alloxanthin in *Dinophysis norvegica* (Dinophysiales, Dinophyceae) from the Baltic Sea. *J. Phycol.* 34, 280–285.
- Miles, C. O., Wilkins, A. L., Samdal, I. A., Sandvik, M., Petersen, D., Quilliam, M. A., Nausvoll, L. J., Rundberget, T., Torgersen, T., Hovgaard, P., Jensen, D. J., Cooney, J. M., 2004. A novel pectenotoxin, PTX-12, in *Dinophysis* spp. and shellfish from Norway. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1423–1433.
- Miles, C. O., I. A. Samdal, J. A. B. Aasen, D. J. Jensen, M. A. Quilliam, D. Petersen, L. M. Briggs, A. L. Wilkins, F. Rise, J. M. Cooney, and A. L. MacKenzie, 2005. Evidence for numerous analogs of yessotoxin in *Protoceratium reticulatum*. *Harmful Algae* 4, 1075–1091.
- Miller C. B., Wheeler P., 2012. Biological Oceanography. Malden, MA: Black.
- Moestrup, Ø.; Akselmann, R.; Fraga, S.; Hoppenrath, M.; Iwataki, M.; Komárek, J.; Larsen, J.; Lundholm, N.; Zingone, A. (Eds) (2009 onwards). IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae. Accessed at <http://www.marinespecies.org/hab> on 2017-09-01
- Montoya, N. G., Akselman, R., Franco, J. M., Carreto, J. I., 1996. Paralytic shellfish toxins and mackerel (*Scomber japonicus*) mortality in the Argentine Sea. En: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M. L., Wyatt, T. (Eds.), Harmful algae. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Publishers, pp. 417–420.
- Montoya, N. G., Akselman, R., Pajaro, M., Perrota, R.G., Carreto, J. I., 1997. Mortandad de caballa (*Scomber japonicus*) en la plataforma bonaerense (Mar Argentino) asociada a un florecimiento del dinoflagelado tóxico *Alexandrium tamarense*. *Rev. Inv. Des. Pesq.* 11, 145–152.

- Montoya, N. G., Fulco, V. K., Carignan, M. O., Carreto, J. I., 2010. Toxin variability in cultured and natural populations of *Alexandrium tamarense* from southern South America—Evidences of diversity and environmental regulation. *Toxicon* 56 (8), 1408–1418.
- Montoya, N. G., Carignan, M. O., Benavides, H. O., 2013. Toxinas emergentes en el Mar Argentino. In: Reunión Latino-americana sobre Algas Nocivas, Florianópolis, Brasil, p. 12.
- Montoya, N. & Carreto, J. I., 2007. Informe sobre mortandad de aves marinas ocurrida en las costas de Chubut (noviembre de 2006), asociada a la presencia de toxinas paralizantes de moluscos. INIDEP, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Moore, S. K., Trainer, V. L., Mantua, N. J., Parker, M. S., Laws, E. A., Baker, L. C., Fleming, L. E., 2008. Impacts of climate variability and future climate change on harmful algal blooms and human health. *Environ. Health* 7(2).
- Morales-Ramírez, A., Viquez, R., Rodríguez, K., Vargas, M., 2001. Marea roja producida por *Lingulodinium polyedrum* (Peridiniales, Dinophyceae) en Bahía Culebra, Golfo de Papagayo, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 49 (2), 19–23.
- Moroño, A., Arévalo, F., Fernández, M. L., Maneiro, J., Pazos, Y., Salgado, C., Blanco, J., 2003. Accumulation and transformation of DSP toxins in mussels *Mytilus galloprovincialis* during a toxic episode caused by *Dinophysis acuminata*. *Aquat. Toxicol.* 62, 269–280.
- Morton, S. L., 2000. Detection of Dinophysistoxin-1 along the coast of Maine. In: Abstracts of the IX International Conference on Harmful Algal Blooms, Hobart, Tasmania, Australia, 7-11, p. 182.
- Munday, R., Towers, N. R., Mackenzie, L., Beuzenberg, V., Holland, P. T., Miles, C. O., 2004. Acute toxicity of gymnodimine to mice. *Toxicon* 44, 173–178.
- Murakami, M., Okita, Y., Matsuda, H., Okino, T., Yamaguchi, K., 1998. From the dinoflagellate *Alexandrium hiranoi*. *Phytochemistry* 48, 85–88.
- Murata, M., Shimatani, M., Sugitani, H., Oshima, Y., Yasumoto, T., 1982. Isolation and structural elucidation of the causative toxin of diarrhetic shellfish poisoning. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 48, 549–552.
- Nagai, S., Suzuki, T., Nishikawa, T., Kamiyama, T., 2011. Differences in the production and excretion kinetics of okadaic acid, dinophysistoxin-1, and pectenotoxin-2 between cultures of *Dinophysis acuminata* and *Dinophysis fortii* isolated from Western Japan. *J. Phycol.* 47, 1326–1337.
- Nagai, S., Suzuki, T., Kamiyama, T., 2013. Successful cultivation of the toxic dinoflagellate *Dinophysis tripos* (Dinophyceae). *Plankton Benthos Res* 8, pp. 171-177.
- Nakajima, M., 1965a. Studies on the source of shellfish poison in Lake Hamana. I. Relation of the abundance of a species of dinoflagellate, *Prorocentrum* sp. to shellfish toxicity. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 31, 198–203.
- Nakajima, M., 1965b. Studies on the source of shellfish poison in Lake Hamana. II. Shellfish toxicity during the ‘red-tide’. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 31, 204–207.
- Nakajima, M., 1965c. Studies on the source of shellfish poison in Lake Hamana. III. Poisonous effects of shellfish feeding on *Prorocentrum* sp. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 31, 281–285.
- Nakajima, M., 1968. Studies on the source of shellfish poison in Lake Hamana. IV. Identification and collection of the noxious dinoflagellates. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 34, 130–131.

- Negri R. M., Montoya N. G., Carreto J. I., Akselman R., Inza D., 2004. *Pseudo-nitzschia australis*, *Mytilus edulis*, *Engraulis anchoita*, and domoic acid in the Argentine Sea. En: Steidinger, K.A., Landsberg, J.H., Tomas, C.R., Vargo, G.A. (Eds.), *Harmful Algae 2002*. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography, and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, St. Petersburg, Florida, USA, pp. 139–141.
- Negri, R. M., Silva, R. I., Segura, V., Cucchi Colleoni, A. D., 2013. Estructura de la comunidad del fitoplancton en el área de El Rincón, Mar Argentino (febrero 2011). *Rev. Invest. Desarr. Pesq.* 23, 7–22.
- Nielsen, L. T., Krock, B., Hansen, P. J., 2012. Effects of light and food availability on toxin production, growth and photosynthesis in *Dinophysis acuminata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 471, 37–51.
- Nishitani, G., Nagai, S., Sakiyama, S., Kamiyama, T., 2008. Successful cultivation of the toxic dinoflagellate *Dinophysis caudata* (Dinophyceae). *Plankton Benthos Res.* 3, 78–85.
- Odebrecht, C., Mendéz, S., García, V. M. T., 1997. Oceanographic processes and HAB in the subtropical southwestern Atlantic En: VIII International Conference on Harmful Algae Abstract book, Vigo, Spain, pp. 28–368.
- Odebrecht, C., Azevedo, S. M. E. O., García, V. M. T., Huszar V. L. M., Magalhães, V. E., Menezes, M., Proença, L. A. O., Rörig, L. R., Tenenbaum, D. R., Villac, M. C., Yunes, J. S., 2002. Floraciones de microalgas nocivas en Brasil: Estado del arte y proyectos en curso. En: Sar, E. A., Ferrario, M. E., Reguera, B. (Eds.), *Floraciones algales nocivas en el Cono Sur Americano*. Instituto Español de Oceanografía, Madrid, pp. 219–233.
- Okaichi, T., Imatomi, Y., 1979. Toxicity of *Prorocentrum minimum* var. *mariae-lebouriae* assumed to be a causative agent of short-neck clam poisoning. En: Taylor, D. L., Seliger, H. H. (Eds.), *Toxic Dinoflagellate Blooms*. Elsevier, North-Holland, New York, pp. 385–388.
- Okolodkov, Y. B. & Dodge, J. D., 1996. Biodiversity and biogeography of planktonic dinoflagellates in the Arctic Ocean. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 202, 19–27.
- Olguin, H.F., Alder, V.A., 2011. Species composition and biogeography of diatoms in antarctic and subantarctic (Argentine shelf) waters (37–76S). *Deep-Sea Research II* 58, 139–152.
- Omachi, C. Y., Tamanaha, M. S., De Oliveira Proença, L. A., 2007. Bloom of *Alexandrium fraterculus* in coastal waters off Itajaí, S. C., southern Brazil. *Braz. J. Oceanogr.* 55, 57–61.
- Otero, P., Alfonso, A., Vieytes, M. R., Cabado, A.G., Vieites, J. M., Botana, L. M., 2010. Effects of environmental regimens on the toxin profile of *Alexandrium ostenfeldii*. *Env.Tox. Chem.* 29, 301–310.
- Palma, E. D., Matano, R. P., Piola, A. R., 2004. A numerical study of the South Western Atlantic Shelf circulation: barotropic response to tidal and wind forcing. *J. Geophys. Res.* 109, C08014, <http://dx.doi.org/10.1029/2004JC002315>.
- Park, M. G., Sunju, K., Hyung Seop, K., Myung, G., Yi Gu, K., Yih, W., 2006. First successful culture of the marine dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. *Aquat. Microb. Ecol.* 45, 101–110.
- Park, T. G., De Salas, M. F., Bolch, C. J. S., Hallegraeff, G. M., 2007. Development of a Real-time PCR probe for quantification of the heterotrophic dinoflagellate

- Pavela- Vrančič, M., Meštrović, V., Marasović, I., Gillman, M., Furey, A., James, K.K., 2001. The occurrence of 7-epi-pectenotoxin-2 seco acid in the coastal waters of the central Adriatic (Kastela Bay). *Toxicon* 39, 771–779.
- Paz, B., Riobó, P., Fernández, M. L., Fraga, S., Franco, J. M., 2004. Production and release of yessotoxins by the dinoflagellates *Protoceratium reticulatum* and *Lingulodinium polyedrum* in culture. *Toxicon* 44, 251–258.
- Paz, B., Riobó, P., Ramilo, I., Franco, J.M., 2007. Yessotoxins profile in strains of *Protoceratium reticulatum* from Spain and USA. *Toxicon* 50, 1–17.
- Paz, B., Blanco, J., Franco, J. M., 2013. Yessotoxins production during the culture of *Protoceratium reticulatum* strains isolated from Galician Rias Baixas (NW Spain). *Harmful Algae* 21–22, 13–19.
- Penna, A., Fraga, S., Maso, M., Giacobbe, M. G., Bravo, I., Garcés, E., Vila, M., Bertozzini, E., Andreoni, F., Luglie, A., Vernesi, C., 2008. Phylogenetic relationships among the Mediterranean *Alexandrium* (Dinophyceae) species based on sequences of 5.8S gene and internal transcript spacers of the rRNA operon. *Eur. J. Phycol.* 43, 163–178.
- Peña-Manjarrez, J. L., Gaxiola-Castro, G., Helenes-Escamilla, J., 2009. Environmental factors influencing the variability of *Lingulodinium polyedrum* and *Scrippsiella trochoidea* (Dinophyceae) cyst production. *Cienc. Mar.* 35, 1–14.
- Percopo I., Siano R., Rossi R., Soprano V., Sarno D., Zingone A., 2013. A new potentially toxic *Azadinium* species (Dinophyceae) from the Mediterranean Sea, *A. dexteroporum* sp. nov. *J. Phycol.* 49, 950–966.
- Persich, G. R., Kulis, D. M., Lilly, E. L., Anderson, D. M. & Garcia, V. M. T. 2006. Probable origin and toxin profile of *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech from southern Brazil. *Harmful Algae* 5, 36–44.
- Piola, A. R. & Matano, R. P., 2001. The South Atlantic Western Boundary Currents Brazil/Falkland (Malvinas) Currents. Steele, J. M., Thorpe, S. A., and Turekian, K. K., (Eds.), Encyclopedia of Ocean Sciences. Academic Press 1, 340–349.
- Piola, A. R. & Falabella, V., 2009. El mar Patagónico. En: Falabella, V., Campagna, C., Croxall, J. (Eds.), El Mar Patagónico: Especies y Espacios. Wildlife Conservation Society e Birdlife International, Cambridge, pp. 56–75.
- Pizarro, G., 2008. Estudio, mediante LC-MS, de la variabilidad del perfil y contenido de toxinas en poblaciones de *Dinophysis* spp. agentes de episodios DSP en las Rías Baixas Gallegas. Tesis Doctoral. Universidad de Vigo.
- Potvin, E., Jeong, H. J., Kang, N. S., Tillmann, U., Krock, B., 2012. First report of the photosynthetic dinoflagellate genus *Azadinium* in the Pacific Ocean: morphology and molecular characterization of *A. cf. poporum*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59, 145–156.
- Proença, L. A. O., Tamanaha, M. S., Resgalla, C., Jr., 2002. Toxicity of the aqueous extract of *Alexandrium fraterculus* Balech. En: Steidinger, K. A., Landsberg, J. H., Tomas, C. R. & Vargo, G. A. (Eds.), Abstracts of the 10th International Conference on Harmful Algae. St. Pete Beach, Florida, p. 235.

- Prud'homme van Reine, W. F., 2017. Report of the Nomenclature Committee for Alga, 15. *Taxon* 66,191–192.
- Quilliam, M. A. & Ross, N. W., 1996. Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins and metabolites in plankton and shellfish by ion-spray liquid chromatography-mass spectrometry. En: Snyder, A. P. (Ed.), Biochemical and biotechnological applications of electrospray ionization mass spectrometry. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 351–364.
- Quilliam M. A., 2003. Chemical methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin. En: Hallegraeff, G. M. Anderson D. M. & Cembella A. D. (Eds.), Manual on harmful marine microalgae, Monographs on Oceanographic Methodology, Intergovernmental Oceanographic Commission (UNESCO), Paris, pp. 247–266.
- Ranston, E. R., Webber, D. F., Larsen, J., 2007. The first description of the potentially toxic dinoflagellate, *Alexandrium minutum* in Hunts Bay, Kingston Harbour, Jamaica. *Harmful Algae* 16, 29–47.
- Reguera, B., González-Gil, S., 2001. Small cells and intermediate cell formation in species of *Dinophysis* (Dinophyceae, Dinophysiales). *J. Phycol.* 37, 318–338.
- Reguera, B., 2002. Establecimiento de un programa de seguimiento de microalgas tóxicas. En Sar, E. A., Ferrario, M. E. & Reguera, B., (Eds.), Floraciones Algaes Nocivas en el Cono Sur Americano, 21–54. Instituto Español de Oceanografía.
- Reguera, B., 2003. Biología, autoecología y toxínología de las principales especies del género *Dinophysis* asociadas a episodios de Intoxicación Diarreogénica por Bivalvos (DSP). Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona.
- Reguera, B & Pizarro, G., 2008. Planktonic dinoflagellates that contain polyether toxins of the old “DSP complex”. En: Botana, L. M. (Ed.), Seafood and freshwater toxins. Pharmacology physiology, and detection. CRC Press, Boca Raton, pp. 257–284.
- Reguera, B., Velo-Suárez, L., Raine, R., Park, M. G., 2012. Harmful *Dinophysis* species: A review. *Harmful Algae* 14, 87–106.
- Reguera, B., Riobó, P., Rodríguez, F., Díaz, P. A., Pizarro, G., Paz, B., Franco, J. M., Blanco, J., 2014. *Dinophysis* toxins: causative organisms, distribution and fate in shellfish. *Mar. Drugs* 12, 394–461.
- Reinecke, P., 1967: *Gonyaulax grindleyi* sp. nov.: a dinoflagellate causing a red tide at Elands Bay, Cape Province, in December 1966. 1. *South Afr. Bot.* 33, 157–160.
- Rhodes, L. L., Haywood, A. J., Ballantine, W. J., MacKenzie, A. L., 1993. Algal blooms and climate anomalies in North-east New Zealand, August–December 1992. *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* 27, 419–30.
- Rhodes, L. L., McNabb, P., De Salas, M., Briggs, L., Beuzenberg, V., Gladstone, M., 2006. Yessotoxin production by *Gonyaulax Spinifera*. *Harmful Algae* 5, 148–155.
- Riccardi, M., Guerrini, F., Roncarati, F., Milandri, A., Cangini, M., Pigozzi, S., Riccardi, E., Ceredi, A., Ciminiello, P., Dell’Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Pistocchi, R., 2009. *Gonyaulax spinifera* from the Adriatic sea: toxin production and phylogenetic analysis. *Harmful Algae* 8, 279–290.

- Rivas, A. L., 1994. Spatial variation of the annual cycle of temperature in the Patagonian shelf between 40° and 50° of south latitude. *Cont. Shelf Res.*, 14, 1539–1554.
- Rivas, A. L., Dogliotti A. I., Gagliardini, D. A., 2006. Seasonal variability in satellite-measured surface chlorophyll in the Patagonia Shelf. *Cont. Shelf Res.* 26: 703–720
- Rodriguez B., P. A., Méndez, S., Ferrari, G., 1997. The first toxic bloom of *Alexandrium tamarense* in Uruguay: Associated Environmental Factors. *Atlántica* 19,19–29.
- Rodríguez, F., Escalera, L., Reguera, B., Rial, P., Riobó, P., Silva T. J., 2012. Morphological variability, toxinology and genetics of the dinoflagellate *Dinophysis tripos* (Dinophysiaceae, Dinophysiales). *Harmful Algae* 13, 26–33.
- Romero, S. I., Piola, A., Charo, M., Garcia, C. A. E., 2006. Chlorophyll a variability off Patagonia based on SeaWiFS data. *J. Geophys. Res-Oceans* 111, C05021.
- Rossi, E., Fiorillo, I., 2010. Biochemical features of *Protoceratium reticulatum* red tide in Chipana Bay (Northern Chile) in summer conditions. *Sci. Mar.* 74 (4), 633–642.
- Rossi, R., Dell'Aversano, C., Krock, B., Ciminiello, P., Percopo, I., Tillmann, U., Soprano, V., Zingone, A., 2017. Mediterranean *Azadinium dexteroporum* (Dinophyceae) produces six novel azaspiracids and azaspiracid-35: a structural study by a multi-platform mass spectrometry approach. *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (4), 1121–1134.
- Sabatini, M. E., R. Reta, R. Matano, 2004. Circulation and zooplankton biomass distribution over the southern Patagonian shelf during late summer. *Cont. Shelf Res.* 24, 1359–1373.
- Sabatini, M., Akselman R, Reta R, Negri, M. R., 2012. Spring plankton communities in the southern Patagonian shelf: hydrography, mesozooplankton patterns and trophic relationships. *J Mar Syst* 94, 33–51.
- Saldarriaga, J. F., Taylor, F. J. R., Cavalier-Smith T., Menden-Deuer, S., Keeling, P. J., 2004. Molecular data and the evolutionary history of dinoflagellates. *Eur. J. Protistol.* 40:85–111.
- Salgado, P., Riobó, P., Rodríguez, F., Franco, J. M., Bravo, I., 2015. Differences in the toxin profiles of *Alexandrium ostensefeldii* (Dinophyceae) strains isolated from different geographic origins: evidence of paralytic toxin, spirolide, and gymnodimine. *Toxicon* 103, 85–98.
- Santinelli, N, Sastre, A, Esteves J.L., 2002. Episodios de algas nocivas en la Patagonia Argentina. En: Sar EA, Ferrario ME, Reguera B (Eds), *Floraciones Algas Nocivas en el Cono Sur Americano*. Instituto Español Oceanográfico de Madrid, Vigo, pp. 199–208.
- Sar E. A., Sunesen I., Lavigne A. S., Goya A. B., 2010. *Dinophysis* spp. asociadas a detección de toxinas diarreicas en moluscos (DSTs) y a intoxicación diarreica en humanos (Provincia de Buenos Aires, Argentina). *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 45, 451–460.
- Sar, E. A., Sunsen, I., Goya, A. B., Lavigne, A. S., Tapias, E., García, C., Lagos, N., 2012. First report of diarrhetic shellfish toxins in mollusks from Buenos Aires Province (Argentina) associated with *Dinophysis* spp.: evidence of okadaic acid, dino-physis toxin-1 and their acyl derivatives. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 47, 5–14.
- Satake, M., MacKenzie, L., Yasumoto, T., 1997. Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenic origin of yessotoxin. *Nat. Toxicol.* 5, 164–167.

- Satake, M., Ofuji, K., Naoki, H., James, K. J., Furey, A., McMahon, T., Silke, J., Yasumoto, T., 1998. Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, *Mytilus edulis*. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 120, 9967–9968.
- Satake, M., Ichimura, T., Sekiguchi, K., Yoshimatsu, S., Oshima, Y., 1999. Confirmation of yessotoxin and 45, 46, 47- Trinoryessotoxin production by *Protoceraatium reticulatum* collected in Japan. *Nat. Toxins* 7, 147–150.
- Schramm, M. A., Alves, T.P., Honorato, M. C., Proença, L. A. O., 2010. Primeira detecção de ficotoxinas lipofílicas em mexilhões da Armação do Itapocorói em Santa Catarina através de LC-MS/MS. En: XIII Congresso Brasileiro de Ficologia, Paraty, RJ, Resumos.
- Segura, V., Lutz, V. A., Dogliotti, A. I., Silva, R., Negri, R., Akselman, R., 2013. Phytoplankton Types and primary production in the Argentine Sea. *Marine Ecology Progress Series* 491, 15–31.
- Siegel, D. A., Doney, S. C., Yoder, J. A., 2002. The North Atlantic spring phytoplankton bloom and Sverdrup's Critical Depth Hypothesis. *Science* 296, 730–33.
- Silva, R. I., Negri, R.M., Lutz, V., 2009. Summer succession of ultraphytoplankton at the EPEA coastal station (Northern Argentina). *J. Plank. Res.* 31, 44758.
- Smayda, T. J., Trainer, V. L., 2010. Dinoflagellate blooms in upwelling systems: Seeding, variability, and contrasts with diatom bloom behaviour. *Progress in Oceanography* 85, 92–107.
- Smith, J. L., Tong, M., Fux, E., Anderson, D. M., 2012. Toxin production, retention, and extracellular release by *Dinophysis acuminata* during extended stationary phase and culture decline. *Harmful Algae* 19, 125–132.
- Snyder, R. V., Gibbs, P. D. L., Palacios, A., Abiy, L., Dickey, R., Lopez, J. V., Rein, K. S., 2003. Polyketide synthase genes from marine dinoflagellates. *Mar. Biotechnol.* 5(1), 1–12.
- Sommer, U & Lengfellner, K., 2008. Climate change and the timing, magnitude and composition of the phytoplankton spring bloom. *Glob. Chang. Biol.* 14, 1199–208.
- Stein, F. R., 1883. Der Organismus der Infusionsthiere Nach Eigenen Forschungen in Systematischer Reihenfolge Bearbeitet. III. Abth. II. Hälfte. Die Naturgeschichte der Arhtodelen Flagellaten. Wilhelm Engelmann, Leipzig, Germany, 30 pp.
- Stüken, A., Orr, R. J. S., Kellmann, R., Murray, S. A., Neilan, B. A., Jakobsen, K. S., 2011. Discovery of nuclear-encoded genes for the neurotoxin saxitoxin in dinoflagellates. *PLoS One* 6, p. 20096.
- Suikkanen, S., Kremp, A., Hautala, H., Krock, B., 2013. Paralytic shellfish toxins or spirolides? The role of environmental and genetic factors in toxin production of the *Alexandrium ostenfeldii* complex. *Harmful Algae* 26, 52–59.
- Sunesen, I, Lavigne A., Goya A, Sar E. A., 2014. Episodios de toxicidad en moluscos de aguas marinas costeras de la Provincia de Buenos Aires (Argentina) asociados a algas tóxicas (marzo de 2008-marzo de 2013). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 49, 327–339.
- Suzuki, T., Mitsuya, T., Matsubara, H., Yamasaki, M., 1998. Determination of pectenotoxin-2 after solid-phase extraction from seawater and from the dinoflagellate *Dinophysis fortii* by liquid chromatography with electrospray mass spectrometry and ultraviolet detection. Evidence of oxidation of pectenotoxin-2 to pectenotoxin-6 in scallops. *J. Chromatogr.* 815, 155–160.

- Suzuki, T.; Mackenzie, L.; Stirling, D.; Adamson, J., 2001a. Conversion of pectenotoxin-2 to pectenotoxin-2 seco acid in the New Zealand scallop, *Pecten novaezelandiae*. *Fish. Sci.* 67, 506–510.
- Suzuki, T.; MacKenzie, L.; Stirling, D.; Adamson, J., 2001b. Pectenotoxin-2 seco acid: A toxin converted from pectenotoxin-2 by the New Zealand Greenshell mussels, *Perna canaliculatus*. *Toxicon*, 39, 507–514.
- Suzuki, T., Horie, Y., Koike, K., Satake, M., Oshima, Y., Iwataki, M., Yoshimatsu, S., 2007. Yessotoxin analogues in several strains of *Protoceraium reticulatum* in Japan determined by liquid chromatography-hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1142, 172–177.
- Takahashi, E., Yu, Q., Eaglesham, G., Connel, D. W., McBroom, J., Costanzo, S., Shaw, G. R., 2007. Occurrence and seasonal variations of algal toxins in water, phytoplankton and shellfish from North Stradbroke Island, Queensland, Australia. *Mar. Environ.* 64, 429–442.
- Taleb, H., Vale, P., Amanhir, R., Benhadouch, A., Sagou, R., Chafik, A., 2006. First detection of azaspirazids in mussels in north west Africa. *J. Shellfish Res* 25, 1067–1070.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
- Tangen, K., 1983. Shellfish poisoning and the occurrence of potentially toxic dinoflagellates in Norwegian waters. *Sarsia* 68, 1–7.
- Tatters, A. O., Van Wagoner, R. M., Wright, J. L. C. & Tomas, C. R., 2012. Regulation of spiroimine neurotoxins and hemolytic activity in laboratory cultures of the dinoflagellate *Alexandrium peruvianum* (Balech and Mendiola) Balech and Tangen. *Harmful Algae* 19, 60–168.
- Taylor, F. J. R., 1976. Dinoflagellates from the international Indian Ocean expedition: a report of the material collected by the R.V. Anton Bruun 1963–1964. *Bibliotheca Botanica* 132. Stuttgart, Germany.
- Taylor, F. J. R., Fukuyo, Y., Larsen, J., Hallegraeff, G. M., 2003. Taxonomy of harmful dinoflagellates. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A. D. (Eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. UNESCO Publishing, Paris, pp. 389–482.
- Terao, K., Ito, E., Yanagi, T., Yasumoto, T., 1986. Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. En: Ultrastructural changes in the small intestine and liver of suckling mice induced by dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-1. *Toxicon* 24, 1141–1151.
- Terao, K., Ito, E., Oarada, M., Murata, M., Yasumoto, T., 1990. Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. The effects on mice of yessotoxin isolated from *Patinopecten yessoensis* and of a desulfated derivative. *Toxicon* 28, 1095–1104.
- Tester, P. A., Turner, J. T., Shea, D., 2000. Vectorial transport of toxins from the dinoflagellate *Gymnodinium breve* through copepods to fish. *J. Plank. Res.* 22, 47–62.
- Tett, P. & Edwards, V., 2002. Review of harmful algal blooms in Scottish coastal waters. *Scottish Environment Protection Agency Rep.*, Universidad Napier, Edimburgo, Escocia, 120 pp.
- Tillmann, U., 2004. Interactions between planktonic microalgae and protozoan grazers. *J. Eukaryot. Microbid.* 51, 156–168.

- Tillmann, U., Alpermann, T., John, U., Cembella, A., 2008. Allelochemical interactions and short-term effects of the dinoflagellate *Alexandrium* on selected photoautotrophic and heterotrophic protists. *Harmful Algae* 7, 52–64.
- Tillmann, U., Elbrächter, M., Krock, B., John, U., Cembella, A., 2009. *Azadinium spinosum* gen. et sp. nov. (Dinophyceae) identified as a primary producer of azaspiracid toxins. *Eur. J. Phycol.* 44, 63–79.
- Tillmann, U., Elbrächter, M., John, U., Krock, B., Cembella, A., 2010. *Azadinium obesum* (Dinophyceae), a new nontoxic species in the genus that can produce azaspiracid toxins. *Phycologia* 49 (2), 169–182.
- Tillmann, U., Elbrächter, M., John, U., Krock, B., 2011. A new non-toxic species in the dinoflagellate genus *Azadinium*: *A. poporum* sp. nov. *Eur. J. Phycol.* 46 (1), 74–87.
- Tillmann, U., Salas, R., Gottschling, M., Krock, B., O'Driscoll, D., Elbrächter, M., 2012a. *Amphidoma languida* sp. nov. (Dinophyceae) reveals a close relationship between *Amphidoma* and *Azadinium*. *Protist* 163 (5), 701–719.
- Tillmann, U., Soehner, S., Nézan, E., Krock, B., 2012b. First record of *Azadinium* from the Shetland Islands including the description of *A. polongum* sp. nov. *Harmful Algae* 20, 142–155.
- Tillmann, U., Gottschling, M., Nézan, E., Krock, B., Bilien, G., 2014. Morphological and molecular characterization of three new *Azadinium* species (Amphidomataceae, Dinophyceae) from the Irminger Sea. *Protist* 165, 417–444.
- Tillmann, U., Gottschling, M., Nézan, E., Krock, B., 2015. First record of *Azadinium dexteroporum* and *Amphidoma languida* (Amphidomataceae, Dinophyceae) from the Irminger Sea off Iceland. *Mar. Biodivers. Rec.* 8, 1–11.
- Tillmann, U., Krock, B., Alpermann, T. & Cembella, A. 2016a. Bioactive compounds of marine dinoflagellate isolates from western Greenland and their phylogenetic association within the genus *Alexandrium*. *Harmful Algae* 51, 67–80.
- Tillmann, U., Borel, C. M., Barrera, F., Lara, R., Krock, B., Almandoz, G. O., Witt, M., Trefault, N., 2016b. *Azadinium poporum* from the Argentine continental shelf, Southwestern Atlantic, produces azaspiracid-2 and azaspiracid-2 phosphate. *Harmful Algae* 51, 40–55.
- Tillmann, U., Gottschling, M., Guinder, V., Krock, B., 2017. *Amphidoma parvula* (Amphidomataceae), a new planktonic dinophyte from the Argentine Sea. *Eur. J. Phycol.*, 1–15.
- Tillmann, U. & Akselman, R., 2016. Revisiting the 1991 algal bloom in shelf waters off Argentina: *Azadinium luciferelloides* sp. nov. (Amphidomataceae, Dinophyceae) as the causative species in a diverse community of other amphidomataceans. *Phycol. Res.* 64, 160–175.
- Tillmann, U. & Elbrächter, M., 2010. Plate Overlap Pattern of *Azadinium spinosum* Elbrächter et Tillmann (Dinophyceae), the Newly Discovered Primary Source of Azaspiracid Toxins. En: Ho, K.C., Zhou M. J., Qi, Y. Z. (Eds), Proceedings of the 13th International Conference on Harmful Algae. Environmental Publicationhouse, Hong Kong, pp. 42–44.
- Tillmann, U. & Hansen, P. J., 2009. Allelopathic effects of *Alexandrium tamarense* on other algae: Evidence from mixed growth experiments. *Aquat. Microb. Ecol.* 57, 101–112.

- Tillmann, U. & John, U., 2002. Toxic effects of *Alexandrium* spp. on heterotrophic dinoflagellates: An allelochemical defence mechanism independent of PSP toxins. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 230, 47–58.
- Todd, E. C. D., 1993. Domoic acid and amnesic shellfish poisoning: a review. *J. Food Prot.* 56, 69–83.
- Toebe, K., Alpermann, T. J., Tillmann, U., Krock, B., Cembella, A., John, U., 2013. Molecular discrimination of toxic and non-toxic *Alexandrium* species (Dinophyta) in natural phytoplankton assemblages from the Scottish coast of the North Sea. *Eur. J. Phycol.* 48, 12–26.
- Tomas, C. R., 1997. Identifying Marine Phytoplankton. Academic Press, San Diego, pp. 858.
- Tomas, C. R., van Wagoner, R., Tatters, A. O., Hall, S., White, K., Wright, J. L. C., 2012. *Alexandrium peruvianum* (Balech & Mendiola) Balech and Tangen a new toxic species for coastal North Carolina. *Harmful Algae* 17, 54–63.
- Tonini, M., Palma, E. D., Rivas, A. L., 2007. Simulación numérica de la circulación y frentes térmicos en los golfos norpatagónicos. *Mec. Comput.* 26, 3757–3768.
- Trefault, N., Krock B., Delherbe, N., Cembella, A., Vásquez, M., 2011. Latitudinal transects in the southeastern Pacific Ocean reveal a diverse but patchy distribution of phycotoxins. *Toxicon* 58, 389–397.
- Tubaro, A; Sidari, L; Della-Loggia, R; Yasumoto, T. Reguera, B, Blanco, J, Fenández, ML, Wyatt, T, Eds.; Occurrence of yessotoxin-like toxins in phytoplankton and mussels from northern Adriatic Sea. En: Harmful Algae; Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, 1998; pp. 470–472.
- Turner, A. D. & Goya, A. B., 2015. Occurrence and profiles of lipophilic toxins in shellfish harvested from Argentina. *Toxicon* 102, 32–42.
- Utermöhl, H., 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton Methodik. *Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.* 9, 1–38.
- Van de Waal, D., Tillmann, U., Martens, H., Krock, B., Van Scheepeningen, Y. , John, U., 2015. Characterization of multiple isolates from an *Alexandrium ostenfeldii* bloom in The Netherlands. *Harmful Algae* 49, 94–104.
- Van Dolah, F. M., 2000. Marine Algal Toxins: Origins, Health Effects, and Their Increased Occurrence. *Env. Health Persp.* 108, 133–141.
- Van Wagoner, R. M., Misner, I., Tomas, C. R. & Wright, J. L. C., 2011. Occurrence of 12-methylgymnodimine in a spirolide-producing dinoflagellate *Alexandrium peruvianum* and the biogenetic implications. *Tetrahedron Letters* 52, 4243–4246.
- Vecchio, J., Tartaglione, J. Orozco, J. Gomez, O. & Grikman, G., 1986. Intoxicación por V.P.M. (Marea Roja). *Medicina* 6, 705–707.
- Vila, M., Garcés, E., Maso, M., Camp, J., 2001. Is the distribution of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* expanding along the NW Mediterranean coast. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 222, 73–83.
- Wandscheer, C. B., Vilarino, N., Espina, B., Louzao, M. C., Botana, L. M., 2010. Human muscarinic acetylcholine receptors are a target of the marine toxin 13- desmethyl C spirolide. *Chem. Res. Toxicol.* 23, 1753–1761.

- Wang, L., Zhuang, Y., Zhang, H., Lin, X., Lin, S., 2014. DNA barcoding species in *Alexandrium tamarense* complex using ITS and proposing designation of five species. *Harmful Algae* 31, 100–113.
- Weissbach, A., Rudström, M., Oloffson, M., Béchemin, C., Icely, J. D., Newton, A., Tillmann, U. & Legrand, C. 2011. Phytoplankton allelochemical interactions change microbial food web dynamics. *Limnol. Oceanogr.* 56, 899–909.
- Whittle, K., Gallacher S., 2000. Marine Toxins. *British Medical Bulletin* 56, 236-253.
- Wiese, M., D'Agostino, P. M., Mihali, T. K., Moffitt, M. C., Neilan, B. A., 2010. Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. *Mar. Drugs* 8, 2185–2211.
- Wilkins, A. L., Rehmann, N., Torgersen, T., Rundberget, T., Keogh, M., Petersen, D., Hess, P., Rise, F., Miles, C. O., 2006. Identification of fatty acid esters of Pectenotoxin-2-Seco acid in blue mussels (*Mytilus edulis*) from Ireland. *J. Agric. Food Chem.* 54, 5672–5678.
- Wilson, I. G., 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3741–3751.
- Wilson, C., Sastre A. V., Hoffmeyer M., Rowntree V. J., Fire S. E., Santinelli N. H., Diaz Ovejero S., D'Agostino V., Maron C. F., Doucette G. J., Broadwater M. H., Wang Z., Montoya N., Seger J., Alder F. R., Sironi M., Uhart, M. M., 2015. Southern right whale (*Eubalaena australis*) calf mortality at Península Valdes, Argentina: are harmful algal blooms to blame? *Mar. Mam. Sci.* doi:<http://dx.doi.org/10.1111/mms.12263>.
- Yao, J, Tan, Z, Zhou, D, Guo, M., Xing, L., Yang, S., 2010. Determination of azaspiracid-1 in shellfishes by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Chin J Chrom* 28, 363–367.
- Yasumoto, T., Oshima, Y., Yamaguchi, M., 1978. Occurrence of a New Type of Shellfish Poisoning in the Tohoku District. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 44, 1249.
- Yasumoto, T., Sugawara, W., Fukuyo, Y., Oguri, H., Igarashi, T., Fujita, N., 1980. Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 46, 1405–1411.
- Yasumoto, T., M. Murata, Y. Oshima, M. Sano, G. Matsumoto & J. Clardy. 1985. Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron* 41, 1019–1025.
- Yasumoto, T., 2001. The chemistry and biological function of natural marine toxins. *Chemical Record* 1, 228–242.
- Yoshida, M., Mizushima, K. & Matsuoka, K., 2003. *Alexandrium acatenella* (Gonyaulacales: Dinophyceae): morphological characteristics of vegetative cell and resting cyst. *Plank. Biol. Ecol.* 50, 61–64.
- Zardoya, R., Costas, E., Lopez-Rodas, V., Garrido-Pertierra, A., Bautista, J. M., 1995. Revised dinoflagellate phylogeny inferred from molecular analysis of large-subunit ribosomal RNA gene sequences. *J. Mol. Evol.* 41, 637–645.
- Zingone, A. & Larsen, J., 2014. Dinophysiales. In: IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae. Available at <http://www.marinespecies.org/HAB> (accessed 20.03.14.).